

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004年4月15日 (15.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/031388 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/12, C07K 14/47, 16/18, C12N 5/08, C12Q 1/68
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/009443
- (22) 国際出願日: 2003年7月25日 (25.07.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2002-217233 2002年7月25日 (25.07.2002) JP
- (74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): ソニー株式会社 (SONY CORPORATION) [JP/JP]; 〒141-0001 東京都品川区北品川6丁目7番35号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 水谷 修紀 (MIZUTANI, Shuki) [JP/JP]; 〒270-2241 千葉県松戸市松戸新田2-4-3-9 Chiba (JP). 山田 孝之 (YAMADA, Takayuki) [JP/JP]; 〒273-0105 千葉県鎌ヶ谷市鎌ヶ谷8-1-8 4 ハイツ道野辺201 Chiba (JP).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。



WO 2004/031388 A1

(54) Title: FACTOR PARTICIPATING IN TRANSCRIPTIONAL REGULATION

(54) 発明の名称: 転写調節に関与する因子

(57) Abstract: HDART binds to HDAC (histone deacetylase) and functions as a repressor. Also, HDART directly binds to Skip, which functions as a transcriptional coactivator of a nuclear receptor, to inhibit the transcription of the nuclear receptor. Moreover, HDART can bind to HDAC, which is one of transcriptional corepressors of a nuclear receptor, to thereby strongly inhibit the transcription via histone deacetylation of HDAC. On the other hand, a dominant negative peptide of HDART is obtained and it is confirmed that this peptide activates transcription on the contrary to the full-length HDART protein. In particular, this peptide is superior to all-trans retinoic acid (ATRA) in the activity to activate transcription of retinoic acid receptor.

(57) 要約: HDARTは、HDAC (ヒストン脱アセチル化酵素) に結合しリプレッサーとして機能する。また、HDARTは、核内レセプターの転写コアクチベーターとして機能するSkipと直接結合し、核内レセプターの転写を抑制する。さらに、HDARTは核内レセプターの転写コリプレッサーの一つであり、HDACと結合しHDACのヒストン脱アセチル化により強力に転写を抑制し得る。一方、HDARTのドミナントネガティブペプチドも得られ、このペプチドは完全長のHDARTたんぱく質とは逆に転写を活性化することをも確認した。特にこのペプチドによるレチノイン酸レセプターの転写活性化能はall-trans Retinoic Acid(ATRA)を上回る活性を有していた。

## 明細書

## 転写調節に関与する因子

5 技術分野

本発明は転写調節因子等に関し、特に、核内ホルモンレセプターに起因した転写を調節し得る因子、ペプチドに関する。

背景技術

- 10 ホルモンや脂溶性ビタミンなどは生物の恒常性の維持、エネルギー代謝、分化、成長などに重要な役割を果たしている。これらホルモン等のレセプターは核内に存在する転写調節因子であり、クロマチン DNA の特定部位に結合して、遺伝子の転写反応を調節する。多くの場合、ホルモン等のリガンドがレセプターに結合していない場合には、転写が抑制され、レセプターにリガンドが結合するとクロマチン構造の変化などにより転写が活性化される。この核内レセプターから転写装置に至る経路にはコアクチベーターやコリプレッサーと呼ばれる多くの因子が複合体を形成して働いていることが報告されている。リガンドが結合していないレセプターにはヒストン脱アセチル化酵素を含むコリプレッサー複合体が結合して
- 15 遺伝子発現を抑制し、一方、リガンドが結合することによりレセプターの構造が変化すると、コリプレッサー複合体が離れて代わりにヒストンアセチル化酵素を含むコアクチベーター複合体がリクルートされる。このようなコアクチベーターの一例としては Skip (Ski 相互作用タンパク質、N-CoA62 と称されている) が
- 20 あり、いくつかの核内レセプター (例えば、ビタミン3レセプター、レチノイン酸レセプター、エストロゲンレセプター、およびグルコマルチコイドレセプター)
- 25 一) と直接結合して、これら核内レセプターが媒介する遺伝子発現を増強し得る (Baudino, T. A., Kraichely, D. M., Jefcoat, S. C., Jr., Winchester, S.

K., Partridge, N. C., and MacDonald, P. N. (1998) *J Biol Chem* 273 (26), 16434-41. MacDonald, P. N., Baudino, T. A., Tokumaru, H., Dowd, D. R., and Zhang, C. (2001) *Steroids* 66 (3-5), 171-6.) .

## 5 発明の開示

上述したように、核内レセプターを介した転写の制御メカニズムの概要は明らかにされつつあるが、そのメカニズムにどのような因子が関与するかの解明は残されている。そこで、本発明は、転写調節因子、特に核内レセプターの転写調節にも関与し得る新たな因子を提供することを目的とする。

- 10 本願発明者らは、ショウジョウバエの *crn* (crooked neck) 遺伝子のヒトホモログのクローニングおよびその機能解析の研究を通して、このヒトホモログが核内レセプターを介した転写調節に関与することを見出した。なお、このショウジョウバエ *crn* 遺伝子自体は、胚形成の早期段階で最大の発現レベルになる遺伝子であり、この遺伝子の不活性化は、胚形成の欠陥をひき起こし、主に神経系の発
- 15 達に影響を及ぼすことが報告されている (Zhang, K., Smouse, D., and Perrimon, N. (1991) *Genes Dev* 5 (6), 1080-91) 。 *crn* タンパク質の1つの独特な特徴は、縦列に方向付けられたテトラトリコペプチド反復 (TPR) の16のコピーが存在することである。TPRは、さまざまなタンパク質で見出され、進化中に広まった同義性の34アミノ酸反復モチーフである。TPRタンパク質が関与
- 20 するプロセスとしては、細胞サイクル制御、転写抑制、ストレス応答、タンパク質キナーゼ抑制、およびタンパク質輸送が含まれる (Lamb, J. R., Tugendreich, S., and Hieter, P. (1995) *Trends Biochem Sci* 20 (7), 257-9) 。

- 上記 *crn* 遺伝子のヒトホモログには、コピー数において15と異なるが上記ショウジョウバエ *crn* 遺伝子と同様に多数のTPRが存在する。本願発明者らがクロー
- 25 ニングしたヒト *crn* 遺伝子は既に報告されている転写に関連した転写共役DNA修復に関与するタンパク質 (XAB2) をコードした遺伝子 (Yoshimichi ら、

Journal. Biol. Chem. 275:34931-34937) と一致するものであるが、本願発明者らは、本遺伝子産物が転写抑制に関与することを新たに見出した。特に、本遺伝子産物は、HDAC (ヒストン脱アセチル化酵素) に結合しリプレッサーとして機能することから、本明細書では「HDART (a HDAC associated repressor TPR)」タンパク質と称する。また、本願発明者らは、HDART が、上述した核内レセプターの転写コアクチベーターとして機能する Skip と直接結合し、核内レセプターの転写を抑制することも見出した。さらに、HDART が核内レセプターの転写コリプレッサーの 1 つであり、HDAC と結合し HDAC のヒストン脱アセチル化により強力に転写を抑制し得ることも明らかにした。一方、HDART のドミナントネガティブペプチドも得られ、このペプチドは全長 HDART とは逆に転写を活性化することも確認した。すなわち、本願発明は、HDART の新たに解明した種々の機能に基づくものであり、具体的には、以下の通りである。

(1) 本発明は転写抑制因子をコードした DNA であって、(A) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードした DNA、または、(B) 配列番号 1 に記載の塩基配列からなる DNA である。

(2) 本発明は転写抑制因子をコードした DNA であって、(A) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードした DNA、または (B) 配列番号 1 に記載の塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズする DNA である。

(3) 本発明は上記 (1) または (2) に記載の DNA によりコードされた転写抑制因子である。

(4) 本発明は核内ホルモンレセプターに起因した転写を抑制し得る上記 (3) 記載の転写抑制因子である。

(5) 本発明は転写を活性化し得るペプチドをコードした DNA であって、(A) 配列番号 2 における 1 から 179 位のアミノ酸配列からなるペプチドをコー

ドした DNA、または (B) 配列番号 1 における 1 から 537 塩基までの塩基配列からなる DNA である。

(6) 本発明は転写を活性化し得るペプチドをコードした DNA であって、

(A) 配列番号 2 における 1 から 179 位のアミノ酸配列において 1 若しくは複数  
5 のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されたアミノ酸配列を有する  
ペプチドをコードした DNA、または (B) 配列番号 1 における 1 から 537 塩基  
までの塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズする  
DNA である。

(7) 本発明は上記 (5) または (6) 記載の DNA によりコードされた転写活  
10 性化ペプチドである。

(8) 本発明は上記 (1)、(2)、(5) または (6) のいずれかに記載の  
DNA のうち、少なくとも 15 ヌクレオチド長を有する DNA である。

(9) 本発明は上記 (1)、(2)、(5) または (6) のいずれかに記載の  
DNA が挿入されたベクターである。

15 (10) 本発明は上記 (1)、(2)、(5) または (6) のいずれかに記載  
の DNA または上記 (9) に記載のベクターを保持する宿主細胞である。

(11) 本発明は上記 (3) に記載の因子または上記 (7) に記載のペプチド  
に結合し得る抗体である。

(12) 本発明は上記 (1)、(2)、(5) または (6) のいずれかに記載  
20 の DNA とハイブリダイズし、少なくとも 10 ヌクレオチド長を有する、オリゴ  
ヌクレオチドプローブである。

(13) 本発明は以下の (A) ~ (D) のいずれかが固定された基板である。

(A) 上記 (12) に記載のオリゴヌクレオチドプローブ

(B) 上記 (3) または (4) に記載の転写抑制因子、もしくは該因子の部分ペ  
25 プチド

(C) 上記 (7) に記載の転写活性化ペプチド、もしくは該ペプチドの部分ペ

チド

(D) 上記(11)に記載の抗体

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。なお、本明細書において  
5 予め用いる略語を説明する：HAT（ヒストンアセチルトランスフェラーゼまたは  
ヒストンアセチル化酵素）、HDAC（ヒストンデアセチラーゼまたはヒストン脱ア  
セチル化酵素）、DAPI（4', 6-ジアミジノ2-フェニルインドール）、RAR  
（レチノイン酸レセプター）、GR（グルココルチコイドレセプター）、DBD（DNA  
結合ドメイン）、AD（活性化ドメイン）、ATRA（all-trans Retinoic Acid:全ト  
ランスレチノイン酸）。

- 10 本発明は、転写調節に関する因子に関する。この転写調節因子には、転写を抑  
制する因子と、活性化する因子が含まれる。まず、転写抑制因子について説明す  
る。本発明の転写抑制因子を例示すれば HDART であり、HDART のアミノ酸配列は、  
配列番号2からなる。但し、本発明の転写抑制因子は配列番号2に記載の HDART  
に限定されず、転写抑制活性を有する範囲で、配列番号2に記載のアミノ酸配列  
15 において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加され  
たアミノ酸配列を有するタンパク質、さらには、HDART をコードした DNA（配列  
番号1）とストリンジентな条件でハイブリダイズする DNA によりコードされ  
たタンパク質をも包含される。

- 20 上記 HDART タンパク質は、ヒト細胞の核内で発現していることから、ヒト細胞  
核より得ることができる。この原料となるヒト細胞は、特に限定はないが、一例  
を挙げれば HDART を内在的に発現していることが明らかである 293 細胞を用いる  
ことができる。

- また、アミノ酸置換等を有する HDART 類似タンパク質の調製は、例えば、公知  
の技術であるファージライブラリースクリーニング技術（Molecular Cloning  
25 3<sup>rd</sup> Ed, Chapter 2, pp. 2.1-2.117）やポリメラーゼ連鎖反応（PCR: Molecular  
Cloning 3<sup>rd</sup> Ed, Chapter 8, pp. 8.1-8.126）技術を利用して実施することがで

きる。具体的には、HDART をコードした DNA (配列番号 1) またはその一部をプローブやプライマーとして、配列番号 1 とホモロジーを備えた DNA を得て、この DNA を基にタンパク質を生成することにより得ることができる。ここで得られるタンパク質は、通常、HDART とアミノ酸配列において高いホモロジーを有する。

- 5 この高いホモロジーは、少なくとも 40% 以上、好ましくは 60% 以上、さらに好ましくは 80% 以上、さらに好ましくは 90% 以上、さらに好ましくは 95% 以上、さらに好ましくは少なくとも 97% 以上 (例えば、98 から 99%) の塩基配列の一致を意味する。

- また、上記「ストリンジентなハイブリダイゼーション条件」は、当業者であれば適宜選択することができる。一例としては、25%ホルムアミド、より厳しい条件では 50%ホルムアミド、4×SSC、50mM HEPES pH7.0、10×デンハルト溶液、20 μg/ml 変性サケ精子 DNA を含むハイブリダイゼーション溶液中、42℃で一晩プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、42℃で一晩保温することによりハイブリダイゼーションを実施することが挙げられる。
- 15 その後の洗浄における洗浄液および温度条件は、1×SSC、0.1% SDS、37℃程度で、より厳しい条件としては、0.5×SSC、0.1% SDS、42℃程度で、さらに厳しい条件では、0.2×SSC、0.1% SDS、65℃程度で実施することができる。これら SSC、SDS および温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、適宜改変することは可能である。

- 20 配列のホモロジーは、BLASTn (核酸レベル) や BLASTx (アミノ酸レベル) のプログラム (Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990) を利用して決定することができる。該プログラムは、Karlin and Altschul によるアルゴリズム BLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993) に基づいている。BLASTn によって塩基配列を解析する場合には、パラメーターは例えば score = 100、wordlength = 12 とする。
- 25 また、BLASTx によってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターは例え

ば score = 50、wordlength = 3 とする。また、Gapped BLAST プログラムを用いて、アミノ酸配列を解析する場合は、Altschul ら (Nucleic. Acids. Res. 25:3389-3402, 1997) に記載されているように行うことができる。BLAST と Gapped BLAST プログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である (http://www.ncbi.nlm.nih.gov.)。

配列番号 2 に記載の配列を人為的に改変する場合には、一般的には、全アミノ酸の 10% 以内であり、好ましくは全アミノ酸の 5% 以内であり、さらに好ましくは全アミノ酸の 1% 以内であると考えられるが、転写抑制活性を維持し得る範囲内であれば上記改変割合を超えてアミノ酸配列を置換等してもよい。この人為的にアミノ酸配列を改変する手法は、例えば、公知の手法である deletion-mutant 作製方法、PCR 法、site-directed mutagenesis などにより実行することができる。なお、ここで改変されたタンパク質が、HDART と同様に、転写抑制活性を有するか否かは、後述する実施例に記載されているような種々のレポーター解析法などを用いて転写抑制能を解析し決定することができる。

上記 HDART またはこれに類似したタンパク質は、上述した通り転写抑制活性を有するため、この機能を利用して所望の転写装置に組合せて所望の遺伝子の転写を抑制することができる。この転写装置は、*in vitro* 転写系、*in vivo* 転写系のいずれでもよい。また、HDART の転写抑制能は自律的であることから、本発明の転写抑制因子は単独で用いて転写を抑制させ得る。但し、この場合、HDART は DNA 結合能を有しないため、好ましくは、DNA 結合領域を融合させた融合タンパク質として用いることがよい。また、HDART は HDAC と結合能を有し、HDART は HDAC をリクルートしてヒストン脱アセチル化活性により強力に転写を抑制し得る。そのため、本発明の転写抑制因子は、HDAC と共に用いて、あるいは HDAC を誘導することにより転写を抑制することもできる。なお、HDAC にはタイプ I (HDAC1, HDAC2, HDAC3) とタイプ II (HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8) が存



在することが知られている。本発明の HDART は HDAC2、HDAC5、HDAC7、HDAC8 等と結合するものと考えられることから、本発明においては、HDAC2、HDAC5、HDAC7、HDAC8 を好適に使用することができるが、これらの HDAC に特に限定されるものではなく、タイプ I または II に属するいずれの HDAC を用いることが可能である。

また、HDART は核内レセプターの転写を抑制し得ることから、本発明の転写抑制因子により抑制し得る転写装置としては、好適には核内レセプターを介した転写装置を挙げることができる。この核内レセプターとしては、レチノイン酸レセプター、グルココルチコイドレセプターを好適に挙げることができ、また、本発明の因子が転写抑制し得る範囲でレチノイン X レセプター、ビタミン D レセプター、アンドロゲンレセプター、エストロゲンレセプター、チロイドホルモンレセプターなどのホルモンや脂溶性ビタミンなどに対する核内レセプターなどを含めることができる。そのため、本発明の転写抑制因子は、このような核内レセプターからの転写の不調節、特に過剰に転写が促進されることが起因した疾患の治療に役立ち得る。特に、後述する実施例で示すように、HDART はレチノイン酸レセプターの転写を抑制し、さらには、このレチノイン酸レセプターの転写により誘導する分化をも抑制することが明らかになっているため、レチノイン酸レセプターの転写による分化亢進が起因した疾患の治療薬として本転写抑制因子を応用してもよい。

本発明は上記転写抑制因子をコードした DNA に関する。この DNA としては、例えば配列番号 1 に記載の塩基配列からなる DNA を挙げることができるが、これに限定されるものではなく、上述した配列番号 2 に記載のアミノ酸配列をコードした DNA、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードした DNA、および配列番号 1 に記載の塩基配列からなる DNA とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする DNA などが包含される。

上記 DNA は、配列番号 1 に記載の DNA またはその一部をプローブまたはプライマーとして用い、例えば、ヒト細胞（一例を挙げれば、後述する実施例 1 に示したように、ヒト膵臓の小島細胞）の cDNA ライブラリーなどからハイブリダイゼーションまたはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により得ることができる。他の方法としては、ヒト細胞の mRNA を鋳型に用い、配列番号 1 に記載の DNA の一部を  
5 プライマーとして RT-PCR (Molecular Cloning 3<sup>rd</sup> Ed, Chapter 8, Protocol 8, pp. 8.46-8.53) により得ることもできる。なお、ここでは、ヒト細胞を例に挙げたが、それ以外の哺乳動物細胞、真核細胞などを用いて調製してもよい。また、DNA を単離するためのハイブリダイゼーション条件は、上述した通りである。

10 上記 DNA をクローニングする方法以外にも、DNA 合成機により配列番号 1 に記載の DNA とその相補鎖とをそれぞれ合成し、アニーリングさせて生成してもよい。

上記 DNA は転写抑制因子をコードしていることから、この転写抑制因子を生産するツールとして、または細胞や個体内に導入して転写抑制因子を発現させるツールとして用いることができる。このような目的で用いる場合には、上記 DNA を  
15 発現ベクターなどに組み込むことが好ましい。発現ベクターは、タンパク質生産に用いる翻訳系により、あるいは導入する細胞により適宜選択することができる。

上記 DNA が組み込まれたベクターを用いて転写抑制因子を生産するためには、先ず、上記ベクターを宿主細胞に導入し、この宿主細胞を培養する。これにより、宿主細胞内では上記転写抑制因子が生産される。ここでベクターを細胞に導入する  
20 手法は、用いる細胞に応じて適宜選択することができる。例えば、ウイルスベクターやファージを介した生物学的な手法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法などの化学的な手法、ジーンガン、エレクトロポレーション法などの物理的な手法などを用いることができる。宿主細胞において生産されたタンパク質は、必要に応じて、精製（例えば、アフィニティー精製など）を行った上で使用する  
25 ことができる。

上記 DNA が組み込まれた発現ベクターはまた、細胞内あるいは個体内の所望の

- 転写を抑制する目的で用いることができる。すなわち、この発現ベクターを細胞または個体内に導入し上記転写抑制因子を発現させることにより、所望の転写系を抑制することができる。特に、HDART は自律的な転写抑制能を有するため、本発明の転写抑制因子は単独でも転写抑制活性を発揮し得る。但し、HDART 自身は
- 5 DNA 結合能を有しないため、好ましくは、本転写抑制因子は、所望の遺伝子の制御領域の DNA に結合し得る DNA 結合領域との融合タンパク質として発現させることがよい。これに、標的となる遺伝子の転写を抑制することが可能となる。また、本転写抑制因子は HDAC と結合能を有することから、本転写抑制因子を発現させることにより、HDAC をリクルートさせて転写をさらに強く抑制し得る。
- 10 また、本発明の DNA にコードされた転写抑制因子は核内レセプターの転写を効果的に抑制し得ることから、これら核内レセプターの転写亢進に起因した疾患の治療用組成物として、本 DNA が組み込まれたベクターを応用してもよい。こうした治療目的のベクターとしては、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、アルファウイルスベクター、
- 15 EB ウイルスベクター、パピローマウイルスベクター、フォーミーウイルスベクターなどのウイルスベクターなどが挙げられる。
- 本発明は転写調節因子のうち、上記とは反対に転写を活性化し得るペプチドにも関する。HDART は全長であれば、転写抑制因子として機能するが、HDART のド
- 20 ミナントネガティブペプチドは、逆に転写活性化因子として機能する。このドミナントネガティブペプチドを例示すると、N 末端の 4 つの TPR (以下、「N4TPR」と省略する) をコードしているペプチド、すなわち、配列番号 2 における 1 から 179 位のアミノ酸配列からペプチドを挙げることができるが、これに限定されず転写活性化能を有する範囲で、配列番号 2 における 1 から 179 位のアミノ酸配列
- 25 において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されたアミノ酸配列を有するペプチドを含めることができる。

上記ドミナントネガティブペプチドの調製は、配列番号1のうち1から537までの塩基配列からなるDNAを基にペプチドを合成することにより調整することができる。また、このペプチドとアミノ酸配列において置換等を有するペプチドの合成は、上記配列番号1のうち1から537までの塩基配列に変異（置換、欠失、挿入および／または付加）を加えコドンを変えたDNAを基にペプチド合成することにより調製することができる。

上記ペプチドは、転写活性化能を有するため、所望の転写系の転写を促進させるために用いることができる。特に、実施例に示した通り、HDARTのN4TPRは核内レセプターの転写を活性化することから、これら核内レセプターの転写を促進させるために用いることができる。この核内レセプターとして、好適には、Skipが作用する核内レセプター、例えば、レチノイン酸レセプター、グルココルチコイドレセプター、ビタミンDレセプター、エストロゲンレセプターを挙げることができる。また、本発明のペプチドが転写活性化し得る範囲でレチノインXレセプター、アンドロゲンレセプター、チロイドホルモンレセプターなどのホルモンや脂溶性ビタミンなどに対する核内レセプターなどを含めてもよい。

上記N4TPRによるレチノイン酸レセプターの転写活性化能は、ATRAによる転写活性化能よりも高いことが後述する実施例で示されている。そのため、現在、ATRAによるレチノイン酸レセプターの転写活性化による白血病などの悪性腫瘍の分化誘導療法が行われている。さらに、ビタミンAやATRAを含むその誘導体は、白血病以外にも肝細胞癌(Okuno, M. et al., (2002) Front Biosci 7, 204-18)、卵巣癌(Zhang D. et al., (2000) J Cell Physiol 185 (1), 1-20)、甲状腺癌(Schmutzler C. and Kohrle J. (2000) Thyroid 10 (5), 393-406)、皮膚癌(Niles R. M. (2000) Nutrition 16 (11-12), 1084-9)、膵癌(Riecken E. O. and Rosewicz S. (1999) 10 Suppl 4, 197-200)等で治療に使用され始めており、このATRAに代えて又はATRAと組合せて、本ペプチドを用いることができる。

本発明は、上記転写活性化能を有するペプチドをコードしたDNAに関する。こ

の DNA としては、具体的には、配列番号 2 における 1 から 179 位のアミノ酸配列からなるペプチドをコードした DNA、一例としては、配列番号 1 から 537 塩基までの塩基配列からの DNA を挙げることができるが、これに限定されるものではなく、転写活性化能を有する範囲で、配列番号 2 における 1 から 179 位のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されたアミノ酸配列を有するペプチドをコードした DNA、または配列番号 1 における 1 から 537 塩基までの塩基配列からなる DNA とストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズする DNA を含めることができる。

上記転写活性化ペプチドをコードした DNA は、上述した転写抑制因子をコードした DNA を得た後、例えば、C 末端側を欠失させることに調製することができる。または、DNA 合成機により合成し調製してもよい。

上記 DNA は、上記転写活性化ペプチドを生産するため、または、細胞または個体内に導入して上記転写活性化ペプチドを発現させる目的で用いることができる。ペプチドを生産する目的で上記 DNA を用いる場合には、発現ベクターに組み込むことが望ましい。この場合の発現ベクターは、ペプチドを生産するための転写・翻訳系によって適宜選択することができる。この転写・翻訳系は、*in vitro*、*in vivo* のいずれでもよい。*In vivo* 系の場合には、上記 DNA が組み込まれた発現ベクターを細胞に導入し、細胞を培養することにより、細胞内で上記転写活性化ペプチドが生産される。細胞への導入方法などについては上述と同様である。

上記 DNA を細胞または個体内に導入して上記転写活性化ペプチドを発現させる目的で用いる場合には、上記 DNA を直接、細胞内等に導入し一時的に発現または染色体に挿入させて安定的に発現させてもよく、また、発現ベクターに組み込んで細胞等に導入してもよい。

上述した通り、転写活性化ペプチドは、ATRA のように悪性腫瘍の分化誘導療法に応用し得るため、転写活性化ペプチドを直接用いる代わりに、本 DNA を患者に注入等し上記転写活性化ペプチドを発現させて、上記治療方法に利用してもよ

い。このような目的で使用するためには、上記 DNA を所望の組織または細胞に該 DNA を運搬するためのベクターに組み込み使用することが好ましい。こうした治療目的のベクターとしては、上述したレトロウイルスベクター等のウイルスベクターを用いることができる。

- 5 以上の通り、本発明の転写抑制因子をコードした DNA は、N 末端側をコードした DNA に短くすることにより上記転写活性化ペプチドをコードした DNA に改変し得る。これ以外にも、上記転写抑制因子をコードした DNA または転写活性化ペプチドをコードした DNA はさらに短い一部フラグメントとしても、ハイブリダイゼーション用プローブ、PCR プライマーまたはリボザイム誘導体として利用することができる。これら目的で上記 DNA の一部を用いる場合には、プローブ等としての特異性を保持できる長さ、例えば、15 ヌクレオチド長を有していることが好ましい。本発明は、本発明の DNA（例えば、配列番号 1 に記載の DNA 等）とハイブリダイズし、少なくとも 10 ヌクレオチド長を有するオリゴヌクレオチドプローブを提供する。例えば、こうしたポリヌクレオチドとしては、配列番号 1 に記載の塩基配列からなる DNA またはその相補鎖と特異的にハイブリダイズするものが挙げられる。ここで、「特異的にハイブリダイズする」とは、ハイブリダイゼーションにおいて、他のタンパク質をコードする DNA とクロスハイブリダイゼーションが有意に生じないことを意味する。上記プローブ、プライマーは、転写抑制因子等をコードした DNA のクローニング等に利用することができる。
- 10
- 15
- 20 本発明はまた、上記転写抑制因子または転写活性化ペプチドに結合し得る抗体に関する。本発明の抗体は、上記転写抑制因子または転写活性化ペプチドと特異的に結合し得るものであれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれでもよい。ポリクローナル抗体は、本発明のタンパク質またはその部分ペプチドを必要に応じてフロイントアジュバント等と混合し、周知の方法によりウサギ、
- 25 ヤギ、モルモットなどの非ヒト動物を免疫し、抗体価が上昇したことを確認した上で免疫動物の末梢血から血清を回収することにより調製することができる。一

方、モノクローナル抗体はまた、上記転写抑制因子もしくは転写活性化ペプチドまたはその部分ペプチドを用い、周知の方法によりマウスなどの動物を免疫し、抗体価が上昇した免疫動物の脾臓またはリンパ節を採取し、これら組織中の抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させハイブリドーマを調製する。ハイブリド

5 ーマから産生される抗体を培養上清から回収することにより得ることができる。

これら抗体は、上記転写抑制因子または転写活性化ペプチドをアフィニティー精製する際等に利用することができる他、種々の細胞内における転写抑制因子の発現量を免疫学的に解析するなどの目的で、または転写抑制因子を阻害する目的で利用してもよい。

10 また本発明は、本発明の上記オリゴヌクレオチドが固定された基板を提供する。該基板をバイオチップとすることにより、例えば、被検生物（細胞）における本発明の DNA の発現状態を解析することが可能である。

好ましい態様においては、まず、被検生物（細胞）から本発明の DNA（例えば、配列番号 1 に記載の DNA、またはその部分 DNA 領域）を増幅する。次いで、該

15 DNA とハイブリダイズするヌクレオチドプローブが固定された基板を用意する。次いで、該 DNA と該基板を接触させる。さらに、基板に固定されたヌクレオチドプローブにハイブリダイズした DNA を検出することにより、本発明の DNA の発現状態を解析することができる。

このような方法としては、DNA アレイ法が例示できる。被検生物（細胞）から

20 の DNA 試料の調製は、当業者に周知の方法で行うことができる。該 DNA 試料の調製の好ましい態様においては、細胞から抽出した染色体 DNA を基に調製することができる。染色体 DNA から本方法の DNA 試料を調製するには、例えば本発明の DNA にハイブリダイズするプライマーを用いて、染色体 DNA を鋳型とした PCR 等によって本発明の DNA を調製することも可能である。調製した DNA 試料には、必

25 要に応じて、当業者に周知の方法によって検出のための標識を施すことができる。

本発明において「基板」とは、ヌクレオチドを固定することが可能な板状の材

料を意味し、通常、チップとも呼ばれる。本発明においてヌクレオチドには、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドが含まれる。本発明の基板は、ヌクレオチドを固定することが可能であれば特に制限はないが、一般に DNA アレイ技術で使用される基板を好適に用いることができる。

- 5 一般に DNA アレイは、高密度に基板にプリントされた何千ものヌクレオチドで構成されている。通常これらの DNA は非透過性 (non- porous) の基板の表層にプリントされる。基板の表層は、一般的にはガラスであるが、透過性 (porous) の膜、例えばニトロセルロースメンブレンを使用することができる。

- 本発明において、ヌクレオチドの固定 (アレイ) 方法として、Affymetrix 社  
10 開発によるオリゴヌクレオチドを基本としたアレイが例示できる。オリゴヌクレオチドのアレイにおいて、オリゴヌクレオチドは通常インサイチュ (in situ) で合成される。例えば、photolithographic の技術 (Affymetrix 社)、および化学物質を固定させるためのインクジェット (Rosetta Inpharmatics 社) 技術等によるオリゴヌクレオチドのインサイチュ合成法が既に知られており、いずれの技術  
15 も本発明の基板の作製に利用することができる。

- 基板に固定するヌクレオチドプローブは、本発明の DNA を検出することができるものであれば、特に制限されない。即ち該プローブは、例えば、配列番号 1 に記載の DNA と特異的にハイブリダイズするようなプローブである。特異的なハイブリダイズが可能であれば、ヌクレオチドプローブは、本発明の DNA に対し、完  
20 全に相補的である必要はない。

本発明において基板に結合させるヌクレオチドプローブの長さは、オリゴヌクレオチドを固定する場合は、通常 10~100 ベースであり、好ましくは 10~50 ベースであり、さらに好ましくは 15~25 ベースである。

- 本発明においては、次いで、DNA 試料と該基板を接触させる。本工程により、  
25 上記ヌクレオチドプローブに対し、DNA 試料をハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションの反応液および反応条件は、基板に固定するヌクレオチドプロー



ブの長さ等の諸要因により変動しうるが、一般的に当業者に周知の方法により行うことができる。

本発明においては、次いで、該 DNA 試料と基板に固定されたヌクレオチドプローブとのハイブリダイズの有無または強度を検出する。この検出は、例えば、蛍光シグナルをスキャナー等によって読み取ることによって行うことができる。尚、DNA アレイにおいては、一般的にスライドガラスに固定した DNA をプローブとい

5 光シグナルをスキャナー等によって読み取ることによって行うことができる。尚、DNA アレイにおいては、一般的にスライドガラスに固定した DNA をプローブとい

い、一方溶液中のラベルした DNA をターゲットという。従って、基板に固定された上記ヌクレオチドを、本明細書においてヌクレオチドプローブと記載する。本方法においては、必要に応じて、検出したハイブリダイズの強度を対照と比較す

10 る。上記方法としては、例えば、DNA アレイ法 (SNP 遺伝子変異の戦略、松原謙一・榊佳之、中山書店、p128-135、Nature Genetics (1999) 22:164-167) 等が挙げられ、当業者においては、公知の文献等を参照して、適宜、実施することができる。

また本発明は、本発明のタンパク質もしくは該タンパク質の部分断片が固定された基板を提供する。該基板をバイオチップとすることにより、例えば、本発明のタンパク質と結合する分子の探索、または HDAC 阻害化合物のスクリーニング等を行うことが可能である。

15 れた基板を提供する。該基板をバイオチップとすることにより、例えば、本発明のタンパク質と結合する分子の探索、または HDAC 阻害化合物のスクリーニング等を行うことが可能である。

一般的に、タンパク質を基板へ固定させたものを、プロテインチップと呼ぶ。その原理は DNA チップと同様、スライドガラスや膜の上にタンパク質を高密度に

20 固定し、それらと相互作用する蛋白質や核酸などを検出する。

本発明の HDART タンパク質は、種々の HDAC タンパク質と結合することから、HDAC 阻害化合物のスクリーニングに応用することができる。より具体的には、本発明の HDART タンパク質を固相表面に固定することにより、一つの面に種々の HDAC を結合させることができる。この固相表面に種々の化合物を結合させ、

25 HDAC 活性を計測することにより、HDAC 阻害化合物をスクリーニングすることができる。

上記スクリーニングによって取得される HDAC 阻害化合物の例としては、癌の分化誘導療法で薬剤として用いられるトリコスタチン A を示すことができる。

また、本発明の抗体が固定された基板をバイオチップとすることも可能である。高純度で分離精製された抗体をチップ表面に固定化することにより高密度化が可

5 能である。

本発明の好ましい態様においては、基板上にサンプルをスポットした後、スポット表面に対して親和性を示さないタンパク質やその他の夾雑物を洗浄することにより、溶出させることができる。その後の検出の工程は、当業者においては、基板の種類等を考慮し、適宜、公知の方法で、上記親和性の有無（強弱）を検出

10 することができる。一例を示せば、洗浄後の上記基板へ、エネルギー吸収分子 (EAM) を添加し、乾燥後、質量分析計 (TOF-MS) 装置にかけることにより、スポット表面に結合していたタンパク質の分子量スペクトルを測定することができる。

また、任意の DNA、もしくはペプチドの基板への固定は、当業者においては、公知の方法によって適宜実施することができる。

15

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、HDART は TPR (Tetra trico peptide repeat) タンパク質であり、その構成および類縁の遺伝子との関係を示す。HDART 一次構造の概略的構成を示し、TPR、酸性領域、Skip 相互作用領域および CRN 相同性領域を示している。

20 図 2 は、ヒト HDART とヒト CRN との間の CRN 相同性領域の比較を示す図である。

図 3 は、HDART/CRN タンパク質間の系統樹を示す図である。この系統樹は、GENETYX-MAC プログラムを用いて構築した (ソフトウェア開発)。

図 4 は、外来または内在 HDART と外来 Skip と相互作用を免疫沈降解析により同定した結果を示す写真である。

25 (A) 外来 HDART と外来 Skip との相互作用を解析した結果を示す。レーン 1 は GFP-HDART のみ、レーン 4 は Flag-Skip のみ、またはレーン 2, 3 はその両方

を 293 細胞内で発現させた。レーン 5 は、何もベクターを導入していないコントロールの細胞である。また、レーン 1、2、4 および 5 は、抗-Flag 抗体により、レーン 3 は対照マウス IgG により免疫沈降させたサンプルである。上部 2 つのパネルは、発現された各タンパク質の発現を示し、下部 2 つのパネルは免疫沈降物を示している。なお、それぞれ上段は抗 GFP 抗体、下段は抗 Flag 抗体で免疫プロットした結果を示す。

(B) 内在 HDART と外来 Skip との相互作用を解析した結果を示す。内在に HDART を保持する 293 細胞に Flag-Skip (レーン 1) または Flag-ルシフェラーゼ (レーン 2) を導入後、細胞抽出液を抗 Flag 抗体で免疫沈降させた。何もベクターを導入していないコントロール実験も並行させた (レーン 3)。細胞内での HDART タンパク質の発現状況 (上部パネル)、免疫沈降した Flag (中央パネル)、または HDART (下部パネル) をパネル左「WB」として示す抗体を用いた免疫プロットにより同定した。

図 5 は、Skip、HDART 両タンパク質上の相互作用領域の同定結果を示す。

15 (A) Skip 上の HDART 結合領域部位のマッピング。プラス (+) は、酵母ツーハイブリッドシステムにおける  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性に基づき、相互作用が検出されたことを示す。プラスの数は、その相互作用の相対的強度を表わす。NHR 結合：核ホルモン受容体結合ドメイン、TA；トランス活性化ドメイン。

(B) HDART 上の Skip 結合領域のマッピング。記号は上述と同様である。

20 図 6 は、核内ホルモン (レチノイン酸またはグルココルチコイド) による転写活性化を HDART が抑制することを示すグラフである。

(A) HDART によるレチノイン酸で活性化された転写の濃度依存的抑圧結果を示す。リガンドの不在下で空ベクター (1.0  $\mu$ g) を導入した際の CAT 活性を基準として、補正された CAT 活性を表わした。3 回の反復実験平均および、エラーバーは S. D. を示す。

(B) HDART によるグルココルチコイド活性化を受けた転写の濃度依存的に抑圧

結果を示す。

図 7 は、HDART の細胞内局在を示す写真である。

(A) 内因性 HDART タンパク質の局在化。左側パネルは抗 HDART 抗体（上段）または免疫前血清（下段）を用いた免疫蛍光染色結果を、右側パネルは左側パネル  
5 と対応した視野における DAPI 染色結果を示す。

(B) 生存細胞中の HDART の局在化。Hela 細胞に GFP-HDART 発現ベクター（左上）または GFP 発現ベクター（左下）を導入後の GFP による蛍光発光を観察した結果、および Hoechst 33342 染料を用い核を視覚化した結果（右上）を示す。

10 図 8 は、HDART の自律的なプロモータ抑制活性を示す。

(A) Gal4 リポーター（ルシフェラーゼ）プラスミドを保持する NIH3T3 細胞に異なる量の Gal4 DBD-HDART 発現プラスミド（0、0.1、0.3、0.5  $\mu$ g）を導入した際のプロモータ抑制活性を検討した結果を示す。空ベクターのみ導入した際のルシフェラーゼ活性を基準（100%）として、補正済みルシフェラーゼ値  
15 を表した。3 回の反復実験結果の平均で示し、エラーバーは S. D. を示す。

(B) U-20S 細胞を用いた結果を示す。

図 9 は、HDART と HDAC との直接的な相互作用を示す写真である。

(A) HDART と HDAC との相互作用。293 細胞に GFP-HDART 発現ベクターと Flag-HDACs 発現ベクター（（レーン 1 ; HDAC1、レーン 3 ; HDAC3、レーン 4 ; HDAC4、  
20 レーン 5 ; HDAC6）とをコトランスフェクションした後、抗 FLAG 抗体で免疫沈降および表示された抗体（抗 Flag 抗体または抗 GFP 抗体）により免疫プロットティングを行った結果を示す（それぞれ中央パネル、下部パネル）。なお、レーン 2 は GFP-HDART のみが導入されたサンプルである。また、上部パネルは免疫沈降前のサンプルを用いて GFP-HDART タンパク質の発現を確認した結果を示す。

25 (B) HDART と HDAC3 との直接的相互作用を示す結果である。

図 10 は、HDART の抑制は 2 種の HDAC 阻害物質（トリコスタチン A、酪酸ナト

リウム)によりそれぞれHDARTの抑制が阻害されたことを示す(C、D)。

図11は、HDARTのN末端における4つのTPR(N4TPR)のドミナントネガティブ効果を示す図および写真である。

- (A) N4TPRによる内因性HDARTとSkipと相互作用の阻害。Flag-SkipとGFP
- 5 (レーン1)またはGFP-N4TPR(レーン2)とがトランスフェクションされた293細胞の細胞抽出液を抗Flag抗体で免疫沈降させ、この沈降産物をSDS-PAGEで分離した結果を示す。下方の3つのパネルは、それぞれ免疫沈降されたSkip(上段)、内因性HDART(中央)およびN4TPR(下段)を示す。免疫沈降前のHDARTタンパク質の発現は最上の一つのパネルに示されている。
- 10 (B) レチノイン酸レセプターに起因した転写をN4TPRによって活性化することを示すグラフである。
- (C) グルココルチコイドに起因した転写をN4TPRによって活性化することを示すグラフである。

- 図12は、MM-1-19-P細胞内でのレチノイン酸による分化誘発をHDARTが阻害
- 15 することを示す図および写真である。HDART発現ベクターまたは空ベクターを導入したMM-1-19-P細胞をATRA(2 $\mu$ M)存在下、非存在下での分化誘発を解析した。形質移入された細胞を同定するため、上記ベクターとともにGFPベクターをコトランスフェクションした。GFPによる緑色蛍光発光を標準的顕微鏡写真により撮影した写真(A、B、C、D)、および位相差顕微鏡下で撮影した写真(E、
- 20 F)を示す。

- (A) ATRA(-)かつ空ベクター導入サンプル、(B) ATRA(+)かつ空ベクター導入サンプル、(C) ATRA(-)かつHDART発現ベクター、(D) ATRA(+)かつHDART発現ベクター、(E) (C)と同一視野の位相差写真、(F) (D)と同一視野の位相差写真。パネルFにおいて、黒色矢印ヘッドは未分化GFP陽性細胞を表わし、白色矢印ヘッドは分化された細胞を表わす。(G) グラフは、
- 25 GFP陽性細胞中形態学的に分化した細胞の百万率を示す。4つの独立した実験か

らの結果は、平均および S. D. (エラーバー) として提示されている (Mock および ATRA (+) での HDART の間で  $P < 1\%$ , スチューデントの t テスト)。

#### 発明を実施するための最良の形態

- 5 以下、本発明について、実施例を用いて詳細に説明するが、本発明はこの実施例に限定されるものではない。

##### [実施例 1] ヒト HDART のクローニング

- BLAST データベースを用いてショウジョウバエ crn 遺伝子のヒトホモログを検索したところ、膵臓の小島 mRNA 由来ヒト EST (expressed sequence tag) クロー
- 10 ン #52930 が上記 crn 遺伝子と高い相同性を有することが示された。このクローン #52930 の完全な配列を定法に従い決定した。また更に 5'-RACE 法 (5'-rapid amplification of cDNA ends strategy) により、本遺伝子は、その cDNA の完全長が 2660 塩基からなり、一つの長い読み枠を備えていることを同定した。なお、ここで同定したタンパク質は、後述するように HDAC (ヒストン脱アセチル化酵
- 15 素) に結合しリプレッサーとして機能することから、「HDART (a HDAC associated repressor TPR)」タンパク質と称する。HDART は 855 アミノ酸をコードした高度に保存された TPR タンパク質である (図 1)。DNA 配列から推定される HDART タンパク質は、ヒト CRN タンパク質と明らかに類似していることが示されている。特に、HDART タンパク質の 262 残基から 779 残基の領域は、
- 20 HDART とヒト CRN タンパク質とで高度に保存されている (図 1、2)。数種の種族間でのこのタンパク質の遺伝解析ではこれらは遺伝子ファミリーを形成していることを示した (図 3)。

##### [実施例 2] HDART と転写コアクチベーター Skip との直接的な相互作用

- 25 HDART 上に存在するいくつかの TPR 領域に着目し、これら TPR を介して HDART と相互作用し得るタンパク質が存在するかを解析することとした。

この HDART と結合するタンパク質の単離のために、酵母ツーハイブリットシステムを用いた。具体的には、酵母 MATCHMAKER ツーハイブリッド解析キット (Clontech) を用いて実施した。pAS-1 ベクター (Clontech) 内で Gal4 DNA 結合ドメインと読み枠を合わせるように HDART の ORF 全長を挿入した。この bait  
5 plasmid は、HeLa cDNA ライブラリー (Clontech) がサブクローニングされた pACT2 prey plasmid と共に、サッカロマイセルセルビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*) Y190 に形質転換した。両プラスミドが導入されたクローンのスクリーニングは、キットに添付されたプロトコルに従って実施した。このようにして、約  $1 \times 10^7$  をクローンした結果、数個のクローンを単離した。これらクロー  
10 ンを解析した結果、一つは Skip と一致していた。

哺乳動物細胞内での HDART と Skip との相互作用を免疫沈降解析により確認した。この確認のために、先ず、Flag-Skip 融合タンパク質を発現する Flag-Skip 発現ベクターおよび GFP-HDART 融合タンパク質を発現する GFP-HDART 発現ベクターと (図 4A) を HEK293 細胞に Effectene キット (QIAGEN) を用いてトランスフ  
15 ェクションした。なお、対照実験として、Flag-Skip 発現ベクターのみ、GFP-HDART 発現ベクターのみを同細胞に、同条件でトランスフェクションを行った。

トランスフェクションの 24 時間後、氷上で 30 分間、 $10 \mu\text{l}$  のプロテアーゼ阻害物質カクテル (Sigma # p 8 3 4 0)  $100 \mu\text{l}$  を含有する Nonidet P-40 緩衝液 (50 mM トリス HCl (pH 7.6)、150 mM NaCl、5 mM EDTA、0.  
20 5% Nonidet P-40、1 mM PMSF) 中で細胞溶解することによって、細胞抽出物 (1 mg) を調製した。この抽出物をタンパク質 A/G セファロースビーズ  $40 \mu\text{l}$  とともに 30 分間 4℃ でインキュベートすることによって、予備的に清澄化した。次に、清澄した上清抽出物を 1 時間抗 Flag 抗体または陰性対照のマウス IgG 抗体 ( $2 \mu\text{g}$ ) と共にインキュベートし、その後、 $40 \mu\text{l}$  のタンパク質 A/G セ  
25 ァロースビーズを用いて 30 分間沈降させた。免疫沈降物を 4 回 Nonidet P-40 緩衝液で洗浄した。結合したタンパク質を SDS ローディングバッファ中で A/G

セファロースビーズから溶出させ、溶出液を SDS-PAGE で展開した。展開後、メンブレンに転写し、メンブレンを定法に従い免疫プロットを実施した。この免疫プロット用の抗体としては、抗 FLAG 抗体 M 2 (Sigma) および抗 GFP モノクローナル抗体クローン 1 E 4 (MBL) を用いた。

- 5 上記免疫沈降解析の結果を図 4A に示す。図において上部 2 つのパネルは、各タンパク質の発現結果を示し、下部 2 つのパネルは免疫沈降物を示している。図 4A に示されている通り、上記両複合タンパク質が発現している場合のみ、抗 Flag 抗体により GFP-HDART タンパク質が Flag-Skip 融合タンパク質と共に免疫沈降した (レーン 2)。FLAG-Skip が発現していない条件では、抗 FLAG 抗体により GFP-HDART の沈殿はみられず (レーン 1)、また、陰性対照の抗体を用いた場合も同様に沈殿は観察されなかった (レーン 3)。この結果は、HDART と Skip とが *in vivo* において特異的に相互作用することを示唆している。

- さらに、内在 HDART と外来から導入した Skip との相互作用を解析した。293 細胞 (HDART が高発現している細胞) に Flag-Skip 発現ベクター、または Flag
- 15 ールシフェラーゼ発現ベクターをトランスフェクションし、上述と同様の方法でトランスフェクションから 24 時間後に細胞抽出液を調整した。この細胞抽出液を抗 Flag 抗体とインキュベートし免疫沈降を行った。免疫複合体または免疫沈降前の細胞抽出液を SDS-PAGE で展開し、メンブレンに転写した。この同一のメンブレンを抗 HDART 抗体または抗 Flag 抗体とを用いて免疫プロットングを実施した。その結果を図 4B に示す。なお、図 4B において、上部パネルは細胞抽出液を抗 HDART 抗体で免疫プロットした結果を、中央パネルは抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降後に抗 Flag 抗体で免疫プロットした結果を、下部パネルは抗 Flag
- 20 抗体を用いて免疫沈降後に抗 HDART 抗体で免疫プロットした結果を示す。

- 図 4B に示されているように、Flag-Skip が発現している条件においてのみ、
- 25 抗 Flag 抗体で HDART が共沈殿し (図 4B、レーン 1)、Flag-Luc タンパク質が発現している条件 (レーン 2) および何もトランスフェクションされていない親



の 293 クローンでは (レーン 3)、HDART の共沈殿は見られなかった。

[実施例 3] HDART と Skip との結合領域

HDART との相互作用に関与する Skip 上の領域をマッピングするために、Skip  
5 (N-末端領域 (コドン 1-220)、核内ホルモン結合領域 (NHR bindng、コドン  
221-388)、トランスアクティベーション領域 (TA、コドン 438-536)) 上の  
様々な領域を欠失させた欠失変異シリーズを作成し、上記実施例 2 に記載した  
Gal4 DBD-HDART を用いた酵母ツーハイブリッド解析により HDART と変異 Skip  
との相互作用を解析した。解析結果を図 5A に示す。図 5A の右に示された  
10 「+」記号は  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性のフィルターリフト解析により相互作用  
が検出されたことを示し、「+」数はその相互作用の相対的強度を示す。

「-」記号は相互作用が検出されなかったことを示す。

図 5A に示すように、二つの異なる領域が HDART との相互作用に関与すること  
を発見した。これら領域は、一つが 97-119 残基内であり、もう一つは 220-437  
15 残基内であった。Skip のトランスアクティベーション領域は HDART との結合活  
性には、ほとんど関与しないことが示された。同様のアプローチを HDART 上での  
Skip との相互作用に関与する領域を解析するために実施した。すなわち、Gal4  
DBD-HDART のさまざまな欠失突然変異体を作製し、これを Gal4AD-Skip と作用  
させた際のガラクトシダーゼ活性を解析した。この解析結果を図 5B に示す。4  
20 つの TPR を含む N 末端領域 (1-179 残基) は Skip との相互作用に必要十分であ  
ることが示された (図 5B)。したがって、HDART は N 末端の 4 つの TPR 領域を  
介して Skip と直接相互作用する。

[実施例 4] HDART による核内レセプターに起因した遺伝子の転写抑制

25 上記実施例において HDART が Skip と相互作用し得ることが示されたことから、  
次に、核内レセプターに起因した転写経路に対する HDART の機能的な役割を解析

した。先ず、レチノイン酸レセプターによる転写制御に対する HDART の作用を解析した。この目的のため、CAT 解析をレチノイドレスポンスエレメント

(retinoid response element) の下流にチミジンキナーゼ最小プロモータ

(pTREpal-tata) と CAT 遺伝子を組み込んだ RAR (retinoid acid receptor) レ

5 ポータープラスミドを用いて、CAT 解析を行った。

具体的には、HepG2 細胞に RAR レポータープラスミドと同時に、HDART を定常的に発現する pcDNA3-HDART を Effectene キット (QIAGEN) によりトランスフェク

クションした。なお、pcDNA3-HDART 発現ベクターの導入量を変えて 0、0.5、

1.0  $\mu\text{g}$  とし、各々のトランスフェクションの DNA 量を同一にするために pcDNA

10 の空のベクターで 1  $\mu\text{g}$  になるように調整した。トランスフェクション後、ATRA

( $10^{-8}\text{M}$ ) の存在下または非存在下で生育させ、その際の CAT 活性を測定し

た。測定結果 (図 6) は、ATRA 不存在下での空ベクター 1.0  $\mu\text{g}$  を導入した

CAT 活性を基準にして補正した値を表わした。また、3 回の実験結果の平均およびエラーバーにより標準偏差を示す。

15 図 6 A に示すように、CAT 活性は空のベクター (pcDNA) が導入された細胞では ATRA により 5 倍上昇した。しかしながら、この ATRA で誘導された CAT 活性は HDART により濃度依存的に抑制された。

さらにグルココルチコイドレセプター (GR) による転写制御に対する HDART の作用は GR 陽性 HeLa 細胞内で GR レポータープラスミドを用いて解析した。グル

20 コルチコイド応答性プロモータの転写活性化は、HeLa 細胞および  $10^{-8}\text{M}$  のデキサメタゾンを用いて使用した点を除いて上記レチノイン酸レセプターに対する実験と同様に行った。測定結果の表示も上記と同様に行った。

HDART の共発現は、RAR (レチノイン酸レセプター) 起因トランスアクティベーションで観察された抑制と同程度で、グルココルチコイドに応答したレポーター遺伝子の活性化を抑制した (図 6 B)。これらの結果は、HDART が核内レセプターによって活性化された転写を選択的に抑制することを示している。

## [実施例 5] 細胞核内における HDART の局在

HDART が転写制御に直接関与することが示されたため、HDART は細胞の核内に局在することが予想される。そのため、HDART 組換えタンパク質に対するポリクローナル抗体を作製し、これを免疫蛍光実験により HDART の細胞内の局在を解析することとした。

ポリクローナル抗体の作製は、先ず、大腸菌中で His-HDART (アミノ酸残基 296-431) の融合タンパク質として産生させ、His と親和性がある Ni-NTA 樹脂 (QIAGEN) で精製した。次に、この His-HDART タンパク質をウサギに免疫し、得られた抗 HDART 抗血清を、ProtOn キット 1 (MPS) を用いたアフィニティークロマトグラフィーによりさらに精製した。ここで精製されたウサギ抗 HDART 抗体を、内在的に HDART を保持する HeLa 細胞とインキュベートし、その後、PE (Phycoerythrin) 融合抗ウサギ抗体とインキュベートして、免疫蛍光染色を行った。なお、コントロール実験として、ウサギ抗 HDART 抗体に代えて免疫前のウサギ血清を用いて同様の操作を実行した。また、核の所在を明確にするために、DAPI 染色も行った。

図 7A に示されているように、抗 HDART 抗体を用いた免疫蛍光染色像は、DAPI 染色像と一致した。一方、免疫前血清では、核は染色されなかった。これら結果より、HDART は HeLa 細胞の核内に優勢的に局在していることが示された (図 7)。

また、生存している細胞での HDART の局在を解析した。HeLa 細胞に GFP または GFP-HDART 発現ベクターをトランスフェクションし、24 時間後に GFP による蛍光発光を検出した。また、GFP-HDART 細胞については、核を視覚化するために Hoechst 33342 染料を用いてインキュベーションを行った。

図 7B に示すように、GFP-HDART ベクターをトランスフェクションした細胞では、Hoechst 33342 染料 (右上パネル) で視覚化された核が GFP により蛍光発光

していることが確認された（左上パネル）。特に、GFP-HDARTは、既に報告されている Skip 分子の核スペckルパターン（17）と部分的に類似のパターンを示した。類似の結果は HT1080 細胞および 293 細胞においても観察された（図示せず）。

5

#### [実施例 6] HDART による自律的な抑制機能

HDART がより直接的な抑制に関与すると仮定した場合、自律的な抑制機能を持つであろうことが予想された。この予想を確認するために、HDART を DNA に接続させるために完全長の HDART cDNA を Gal4 DNA 結合領域（GAL4DBD : GAL4DNA と  
10 の結合領域のみを持ち、転写制御領域を持たない領域）に融合させ、NIH3T3 細胞内で GAL4 プロモータからの転写を調節し得るかを解析した。

具体的には、Gal4 レポータープラスミド（pGal4-Luciferase）が予め導入された NIH3T3 細胞に、HDART 全長タンパク質と Gal4 DBD との融合タンパク質を発現する Gal4 DBD-HDART プラスミドを導入量を変えて（0、0.1、0.3、0.5  
15  $\mu\text{g}$ ）トランスフェクションした。なお、トランスフェクションに用いるトータル DNA 量を揃えるために、各々のトランスフェクションにおいて Gal4 DBD の空のベクターを用いて発現ベクターの量を 0.5  $\mu\text{g}$  に調整した。トランスフェクション 24 時間後に、プロモータからのレポーター遺伝子の発現活性（ルシフェラーゼ活性）を解析した。各サンプルのルシフェラーゼ活性は、空のベクターの  
20 み導入した際のルシフェラーゼ活性を基準（100%）として補正した値で表した（図 8）。なお、解析結果は 3 回の実験結果の平均で示し、また、標準偏差をエラーバーにより示した（図 8A）。また、Gal4 DBD-HDART（導入量 0 または 0.5  $\mu\text{g}$ ）を用いて別の細胞 U-20S 細胞においても同様の解析を行った（図 8B）。

HDART は NIH-3T3 細胞内におけるプロモータ活性を濃度依存的に著しく抑制し、  
25 最も高い濃度（0.5  $\mu\text{g}$ ）ではルシフェラーゼの発現を 80% 低下させた（図 8A）。類似の結果は U-20S 細胞でも観察された（図 8B）。これら結果より、HDART そ

れ自身で自律的な転写抑制作用を有していることが示された。

また、GAL4 DNA 結合領域をもたない HDART の場合には、ルシフェラーゼの発現抑制は全く示されなかった（図示せず）。このことは、HDART それ自身ではプロモータ領域の DNA への結合活性を有していないと考えられる。

5

[実施例 7] HDART に起因した抑制メカニズム

急性の転写調節は、HAT（ヒストンアセチル化酵素）による活性化および HDAC（ヒストン脱アセチル化酵素）による抑制が関与するメカニズムを介したコアヒストンのアセチル化の状態により制御されていることが報告されている。HDART  
10 が起因する遺伝子抑制のメカニズムを明らかにするために、この HDART の機能が HDAC との複合体形成を介して発揮されるか否かを Flag-HDAC 発現ベクターを用いた免疫沈降解析により調べた。

異なるタイプの HDAC（1, 3, 4 または 6）を発現し得る Flag-HDACs 発現ベクターと GFP-HDART 発現ベクターとを実施例 2 と同様に 293 細胞にコトランスフ  
15 エクションし、トランスフェクション 24 時間後に細胞抽出液を調整した。各細胞抽出液を抗 Flag 抗体とインキュベートして免疫沈降を行った。免疫沈降産物を SDS-PAGE により分離し、分離したパターンをメンブレンに転写後、抗 Flag 抗体または抗 GFP 抗体を用いて免疫ブロッティングを行った。参照として、各細胞  
20 同様に SDS-PAGE で展開し、抗 GFP 抗体を用いた免疫ブロッティングを実行した。なお、図 9A において、上部パネルに免疫沈降前の GFP-HDART タンパク質の発現結果を示し、中央パネルは免疫沈降産物を抗 Flag 抗体で免疫ブロッティングした結果を示し、さらに、下部パネルは免疫沈降産物を抗 GFP 抗体で免疫ブロッティングした結果を示す。また、HDAC の種類は図左から次の通り：レーン 1 ;  
25 HDAC1、レーン 3 ; HDAC3、レーン 4 ; HDAC4、レーン 5 ; HDAC6 である。なお、レーン 2 は GFP-HDART のみを発現させたサンプルである。

図 9A に示すように、Flag-HDAC 発現ベクターと GFP-HDART 発現ベクターとが  
コトランスフェクションされた 293 細胞由来の抽出液では、抗 FLAG 抗体によっ  
て GFP-HDART が免疫沈降したことが確認された（下部パネル、左よりレーン 1、  
3, 4, 5）。しかし、FLAG-HDAC 非存在下（Flag-HDAC 発現ベクターが導入さ  
5 れていない株）では、抗 FLAG 抗体を添加しても GFP-HDART の沈降は見られな  
かった（下部パネル、レーン 2）。従って、抗 FLAG 抗体による GFP-HDART の沈殿  
は、Flag-HDAC と GFP-HDART との特異的な相互作用によることが示された。また、  
HDART はタイプ I（HDAC1 および 3）とタイプ II（HDAC4 および 6）の両タイプの  
HDAC と相互作用することも示された。

- 10 さらに、HDART と HDAC3 との直接的な相互作用を GST プルダウン解析により調  
べた。GST プルダウン解析は基本的に既知の方法に従って実施した（Tzamarias,  
D., and Struhl, K. (1995) *Genes Dev* 9 (7), 821-31.）。TNT（登録商標）*in*  
*vitro* 転写・翻訳システム（Promega）を用い、<sup>35</sup>S-メチオニン存在下で  
HDAC3 の *in vitro* 翻訳を行った。GST タンパク質または GST-HDART 融合タンパ  
15 ク質は、それぞれ大腸菌内で発現させ、GST 結合緩衝液（50mM トリス-HCl、  
200mM LiCl、0.5% NP40、5mM EDTA、1mM PMSF）中、グルタチオンセファロース  
を用いて精製した。GST 結合緩衝液 1 ml 中 GST-HDART 融合タンパク質または対  
照 GST タンパク質（約 1 μg）と <sup>35</sup>S-放射線標識 *in vitro* 翻訳産物（10 μl）  
とを含有した結合反応液を調製した。この反応液を振とうしながら 4℃、1 時間  
20 インキュベートした後、セファロース-GST タンパク質複合体を GST 結合緩衝液  
で 5 回洗浄した。GST タンパク質に結合したタンパク質をドデシル硫酸ナトリウ  
ム（SDS）含有サンプル緩衝液中で沸とうさせることにより溶出させ、SDS-ポリ  
アクリルアミドゲル電気泳動により分離した。GST 融合タンパク質が同等に泳動  
されていることをクーマシーブリリアントブルー染色により確認し、さらにオー  
25 トラジオグラフィにより <sup>35</sup>S-放射線標識された HDAC を検出した。

図 9B に示されているように、*In vitro* で翻訳された HDAC3 は、単なる GST

タンパク質とは結合せずプルダウンさせることができなかつたが、GST-HDART 融合タンパク質を用いることによりプルダウンされることが示された (図 9 B)。また図には示されていないが HDAC1 でもまた同様の結果が示された。このことから、この HDART と HDAC との相互作用は直接的であることが示唆された。

- 5 さらに HDART の転写抑制作用に対する HDAC の脱アセチル化活性への影響を解析するために、HDAC を特異的に阻害するトリコスタチン A (TSA) 存在下で、実施例 4 と同様に CAT レポーター解析を行った (図 10 C および D)。但し、本実施例では、一定量の pcDNA3-HDART 発現ベクター (1  $\mu$ g) を用い (図 10 中「HDART+」)、またリガンド (ATRA またはデキサメタゾン) と共に 100nM TSA
- 10 または 1 $\mu$ M 酪酸ナトリウムを添加した。

- 図 10 C、D に示すように、リガンドのみでは対応するプロモータからのリポーター遺伝子の発現は上昇し、そこに HDART を発現させると、発現活性が抑制された。さらにトリコスタチン A が添加されると、HDART による発現抑制が完全に中和された。同一の結果がもう一つのヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、酪酸ナ
- 15 トリウム (Buty) を添加した場合にも観察された。これら結果は、HDART による転写抑制が脱アセチル化酵素活性を介して発揮していることを裏付けている。

[実施例 8] HDART-Skip 相互作用によるリガンド非結合型レセプター (unliganded receptor) の能動抑制

- 20 RAR および TR は、*in vivo* (Baniahmad, A., Kohne, A. C., and Renkawitz, R. (1992) *Embo J* 11 (3), 1015-23) および *in vitro* (Fondell, J. D., Roy, A. L., and Roeder, R. G. (1993) *Genes Dev* 7 (7B), 1400-10.) においてリガンド非存在下で遺伝子活性化を抑制する。このことから、これを能動抑制 (active repression) と称している。また、Skip はリガンド非依存的に NHR と相互作用
- 25 する (MacDonald, P. N., Baudino, T. A., Tokumaru, H., Dowd, D. R., and Zhang, C. (2001) *Steroids* 66 (3-5), 171-6.)。そのため、これら抑制効果お

よび Skip との生理的な関与により、HDART-Skip 複合体がリガンド非結合型レセプター上に存在する可能性、また、この相互作用がレセプターの能動抑制に関与する可能性が示唆された。これら可能性を明らかにするために、HDART のドミナントネガティブ株を過剰発現させ、その際の RAR に起因した転写に対する影響を

5 調べた。実施例 2 に示した通り HDART における N 末端の 4 つの TPR (N4TPR) は Skip 結合領域であるため、この領域の発現が内在 HDART と Skip との相互作用を阻止することで HDART の天然の機能を阻害してドミナントネガティブとして機能することが予想されたため、本実施例では N4TPR をドミナントネガティブ候補として用いた。

10 293 細胞に Flag-Skip および GFP または GFP でタグ付けされた N4TPR をトランスフェクションした。トランスフェクション 24 時間後に細胞抽出物を調製し、抗 Flag 抗体で免疫沈降させた。免疫沈降物を SDS-PAGE 上で分離した。また、免疫沈降前の内在性 HDART の発現を確認するために、免疫沈降前の細胞抽出液も同様に SDS-PAGE で分離した。分離後のパターンをメンブレンに転写した。そして、

15 Flag-Skip の発現については抗 FLAG 抗体を用い、GFP および GFP-N4TPR の発現については抗 GFP 抗体を用い、さらに、内在 HDART の発現については抗 HDART 抗体を用いて、それぞれ検出した (図 1 1 A)。なお、図 1 1 A において、下方の 3 つのパネルは、それぞれ免疫沈降された Skip (下部上)、内因性 HDART (下部中央) および N4TPR (下部下) を示し、上部の一枚のパネルには、免疫沈降前の内

20 因性 HDART タンパク質の発現を示す。

図 1 1 A に示されているように、N4TPR の発現は、N4TPR を発現していない対照 (GFP のみ、レーン 1) に比べて Skip と共沈殿した HDART の量を減少させた (下部中央パネル、レーン 2)。一方、N4TPR の過剰発現は、N4TPR と Skip との相互作用が増加し、共沈殿した Skip の量を著しく上昇させた (レーン 2、lower

25 bottom panel)。コントロールのタンパク質 (GFP) の発現は HDART と Skip との相互作用に対して影響はなかった (レーン 1)。この結果は、N4TPR が HDART に



代わって Skip と相互作用するドミナントネガティブタンパク質として作用することを示している。

- 次に、N4TPR の過剰発現が RAR またはグルココルチコイド応答性プロモータからの転写に与える影響を調べた。なお、ここでは、GFP-N4TPR 発現ベクター
- 5 (0, 0.3, 0.5  $\mu$ g) を用いた点を除いて、上記実施例 4 に記載したレポーター解析と同様の方法により検討した。

- 結果は図 1 1B, C に示した通り、リガンド非存在下で N4TPR を制限して発現させることにより (導入量 0.3  $\mu$ g)、RAR およびグルココルチコイド応答性プロモータからの転写活性をリガンド存在下で誘導した転写活性の程度 (グレーカラ
- 10 ム) まで増加させた。N4TPR の最も高い発現レベルでは (導入量 0.5  $\mu$ g)、リガンド非存在下で転写活性を強く増加 (~約 20 倍) させた。これらの結果は HDART が RAR やグルココルチコイドレセプターなど核内ホルモンレセプターの能動抑制にとって必要であることを示唆している。

- 15 [実施例 9] レチノイン酸誘導による黄紋筋筋腫由来細胞株 (rhabdomyosarcoma cell line) の筋組織への分化を HDART の過剰発現により阻害

- ATRA (All-trans retinoic acid) は、腫瘍細胞分化の重要な誘導剤であることが知られている (20-22)。ヒト黄紋筋筋腫由来細胞株 MM-1-19-P は主に小さな多角形の細胞から構成され、最終的にレチノイン酸を備えた筋管様の巨大細胞
- 20 に分化する。核内ホルモンレセプターに起因した反応における HDART の生理学的な役割を明らかにするために、ATRA による MM-1-19-P の筋組織の分化に対して HDART 発現が与える影響を解析した。

- 100mM のペトリ皿上に MM-1-19-P 細胞を植えつけ、この細胞に 0.4  $\mu$ g の pGFP ベクターと 2  $\mu$ g の pcDNA3 (空ベクター) または pcDNA3-HDART (HDART 発現ベク
- 25 ター) とをコトランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後に、培地を ATRA 含有 (2  $\mu$ M) または非含有の新鮮な培地と交換した。48 時

間の誘導後、細胞が筋管様の巨大細胞を示す細長い紡錘細胞へと変化した時点で、形態学的に分化したものとして細胞を評価した。すべての実験を4回反復し、GFPについて陽性と評価済みの細胞の数をカウントした。結果を図12に示す。

5 Dに、位相差顕微鏡写真をパネルE、Fに示す。また、(A)はATRA非処理かつ空ベクター導入細胞、(B)ATRA処理かつ空ベクター導入細胞、(C)ATRA非処理かつHDART発現ベクター導入細胞、(D)ATRA処理かつHDART発現ベクター導入細胞、(E)上記(C)と同一条件の細胞、(F)上記(D)と同一条件の細胞を示す。また、パネルFでは、黒色矢印は、未分化GFP陽性細胞を表わ

10 し、白色矢印は分化された細胞を指す。(G)グラフは、GFP陽性細胞中の形態学的に分化された細胞の百分率を4回の独立した実験結果の平均で示し、また標準偏差はエラーバーで示されている(空ベクターかつATRA(+)とHDART発現ベクターとの間で $P < 1\%$ 、スチューデントのtテスト)。

各実験において、GFP陽性細胞数は30~70であった。空ベクターを導入し

15 ATRA処理した細胞では、GFP陽性の細胞数はATRAの細胞毒性効果のため30%未満であったが、一方、HDART発現ベクターを導入した細胞では、ATRA処理群、非処理群とでGFP陽性の細胞数は同じであった。

空のベクターが導入された細胞の多くは、ATRA処理によって、筋管様の巨大細胞の出現で示されるように筋組織に分化した(図12B、図12G)。また、空

20 のベクターが導入された細胞では、ATRA処理による表現型の変化の程度はGFP陽性および陰性の細胞の双方で同一であった。しかしながら、HDARTが導入された細胞では、GFP陽性細胞はATRA処理を行っても表現型の変化はほとんどないが(図12D中黒色矢印、図12G)、一方のGFP陰性細胞では特徴的な筋管様巨大細胞が観察された(図12F中白色矢印)。この結果は、HDARTの発現がレ

25 チノイン酸による分化を抑制することを示している。そして、この結果はレポーター解析においてHDARTがRARによる転写活性化を抑制した結果と一致する。こ

これらの結果は HDART が少なくともレチノイン酸レセプターにおける生理学的な転写のコリプレッサーであることを示している。

#### 産業上の利用の可能性

- 5 上述した通り、本発明の転写抑制因子は、自律的に転写を抑制し、特に、核内レセプターの転写を抑制するため、所望の転写系に作用させ、該転写系の転写を抑制する目的で用いることができる。また、本発明の転写抑制因子は HDAC と結合能を有し、この HDAC のヒストン脱アセチル化活性を介して転写抑制能を発揮し得る。したがって、本発明の転写抑制因子を用いて HDAC をリクルートさせ、
- 10 HDAC の作用によって転写抑制を行うこともできる。本発明の転写抑制因子のこのような作用は、例えば核内レセプターの転写亢進が起因している疾患に応用し得るものであり、こうした疾患の治療薬として本転写抑制因子が有益となる。

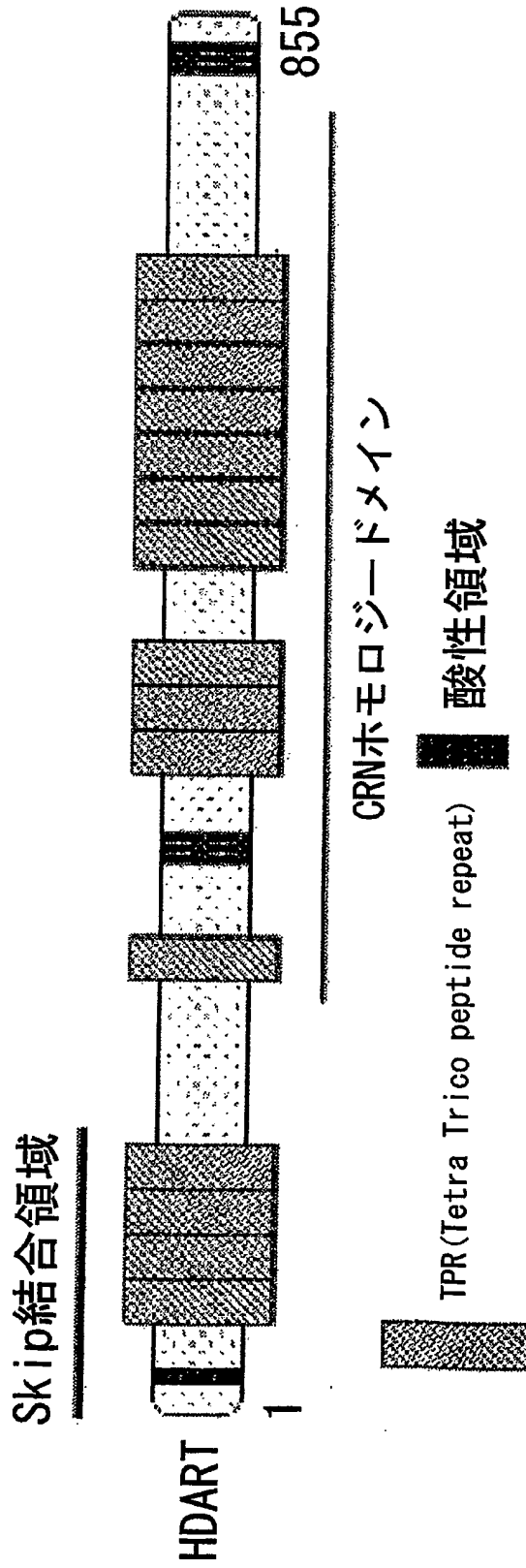
- また、上記転写抑制因子のドミナントネガティブペプチドは、転写活性化因子として機能する。したがって、このドミナントネガティブペプチドは、転写を促進させるために用いることができる。このドミナントネガティブペプチドもまた、
- 15 核内レセプターの転写に作用し、その転写を逆に促進させる。そのため、核内レセプターの転写促進物質として本ペプチドが有益となる。特に、HDART の N 末端側の 4 つの TPR (N4TPR) は、ATRA に比してレチノイン酸レセプターの転写活性化能が高いため、現在 ATRA が用いられている疾患治療（例えば、悪性腫瘍の分
- 20 化誘導療法など）において、ATRA に代えてまたは ATRA と共に本ペプチドを治療薬として応用し得る。

## 請求の範囲

1. 転写抑制因子をコードした DNA であって、
  - (A) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードした DNA、  
5 または、
  - (B) 配列番号 1 に記載の塩基配列からなる DNA。
2. 転写抑制因子をコードした DNA であって、
  - (A) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が  
置換、欠失、挿入および/または付加されたアミノ酸配列を有するタン  
10 パク質をコードした DNA、または
  - (B) 配列番号 1 に記載の塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件下  
でハイブリダイズする DNA。
3. 請求項 1 または 2 に記載の DNA によりコードされた転写抑制因子。
4. 核内ホルモンレセプターに起因した転写を抑制し得る請求項 3 記載の転写  
15 抑制因子。
5. 転写を活性化し得るペプチドをコードした DNA であって、
  - (A) 配列番号 2 における 1 から 179 位のアミノ酸配列からなるペプチドをコ  
ードした DNA、または
  - (B) 配列番号 1 における 1 から 537 塩基までの塩基配列からなる DNA。
- 20 6. 転写を活性化し得るペプチドをコードした DNA であって、
  - (A) 配列番号 2 における 1 から 179 位のアミノ酸配列において 1 若しくは複  
数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されたアミノ酸配  
列を有するペプチドをコードした DNA、または
  - (B) 配列番号 1 における 1 から 537 塩基までの塩基配列からなる DNA とスト  
25 リンジントな条件下でハイブリダイズする DNA。
7. 請求項 5 または 6 に記載の DNA によりコードされた転写活性化ペプチド。

8. 請求項 1、2、5 または 6 のいずれかに記載の DNA のうち、少なくとも 15ヌクレオチド長を有する DNA
9. 請求項 1、2、5 または 6 のいずれかに記載の DNA が挿入されたベクター。
- 5 10. 請求項 1、2、5 または 6 のいずれかに記載の DNA または請求項 9 に記載のベクターを保持する宿主細胞。
11. 請求項 3 に記載の因子または請求項 7 に記載のペプチドに結合し得る抗体。
12. 請求項 1、2、5 または 6 のいずれかに記載の DNA とハイブリダイズし、少なくとも 10ヌクレオチド長を有する、オリゴヌクレオチドプローブ。
- 10 13. 以下の (A) ~ (D) のいずれかが固定された基板。
  - (A) 請求項 1 2 に記載のオリゴヌクレオチドプローブ
  - (B) 請求項 3 または 4 に記載の転写抑制因子、もしくは該因子の部分ペプチド
  - (C) 請求項 7 に記載の転写活性化ペプチド、もしくは該ペプチドの部分ペプチド
- 15 (D) 請求項 1 1 に記載の抗体

図1



☒ 2

Score = 75.5 bits (184), Expect = 3e-12  
 Identities = 134/589 (22%), Positives = 228/589 (37%), Gaps = 127/589 (21%)

HDART: 262 LADYYIRSGHF EKARDVYEEAIRTVMTVRDFTQVFD SYAQFEESMIAAKMETASELGREE 321  
 L DY +R R +E+ IR TV + YAQ+EES+ +++ A +  
 CRN : 208 LNDYKLRK-----RKT FEDNIRKNRTV---ISNWKY AQWEESL--KEIQRARS IYERA 256

HDART: 322 ED----DVDLELRLARFE----QLISRRPLLLNSVLLRQNP HHVHEWIKRVALHQGRPRE 373  
 D ++ LL+ A E Q+ R + ++ P W+K + E  
 CRN : 257 LDVDYRNITLW LKYAEMEMKNRQVNHARNIWDRAITTL--PRV NQFWYKYTYME-----E 309

HDART: 374 IINTYTEAVQTVDPFKATGKPHTLWVAF AKFYEDNGQLDDARVILEKATKVNFKQVDDLA 433  
 ++ A Q ++ W ++ F ++D AR I E+ F V  
 CRN : 310 MLGNVAGARQVFERWMEWQPEEQAWHSYINFELRYKEVDRARTIYER-----FVLVHPDV 364

HDART: 434 SVWCQCGELELRHENYDEALRLLRKATALPARRAEYFDGSEPVQNRVYKSLKVWSMLADL 493  
 W + E +H + A ++ +A E+F G E + +Y + A  
 CRN : 365 KNWIKYARFEEKHAYFAHARKVYERAV-----EFF-GDEHMD EHLVAF-----AKF 410

HDART: 494 EESLGT FQSTKAVYDRILDRLIA---TPQIVINYAMFLEEHKY----- 533  
 EE+ F+ + +Y LD RI+ ++ NY +F E K+  
 CRN : 411 EENQKEFERVRVIYKYALD-RISKQDAQELFKNYTIF--EKKFGDRRGIEDIIVSKRRFQ 467

HDART: 534 FEESFKA-----YERGISLFKWPVNSDIWSTYLTKFI- 565  
 +EE KA YER I+ W Y+ +I  
 CRN : 468 YEEVKANPHNYDAWFDYLRLVESDAEAEAVREYERAIANVPPIQEKRWKRYIYLWIN 527

HDART: 566 ----ARYGGRKLERARDLFEQALDGCPPK---YAKTLYLLYAQLE---EEWGLARHAMAV 615  
 + ER R +++ +L+ P K +AK +++LYAQ E + LAR A+  
 CRN : 528 YALYEELEAKDPERTRQVYQASLELIPHKKFTFAK-MWILYAQFEIRQKNLSLARRALGT 586

HDART: 616 YERATRAVEPAQQYDMFNIIYIKRAAEIYGVTHTRGIYQKAI EVLSDEHAREMC---LRFA 672  
 ++ + +F +YI+ ++ R +Y+K +E E C ++FA  
 CRN : 587 -----SIGKCPKNKLFKVYIELELQLREFDRCKLYEKFLF-----GPENCTSWIKFA 635

HDART: 673 DMECKLGEIDRARAIYSFCSQICDPR--TTGAFWQTKDFEVRHGNEDTIKEMLRIRRSV 730  
 ++E LG+IDRARAIY I PR W+++ DFE+ E+T + RR +  
 CRN : 636 ELETILGDIDRARAIYELA--ISQPRLDMP EVLWKS YIDFEIE--QEETERTRNLYRRL 691

HDART: 731 QATYNTQVNFMASQMLKVSGSATGTVSDLAPGQSGMDDMKLLEQRAEQ 779  
 Q T + +V +Q SG + M+ E++ E+L  
 CRN : 692 QRTQHVKVWISFAQFELSSGKEGSLTKCRQIYEEANKTMRNCEEKEERL 740

図 3

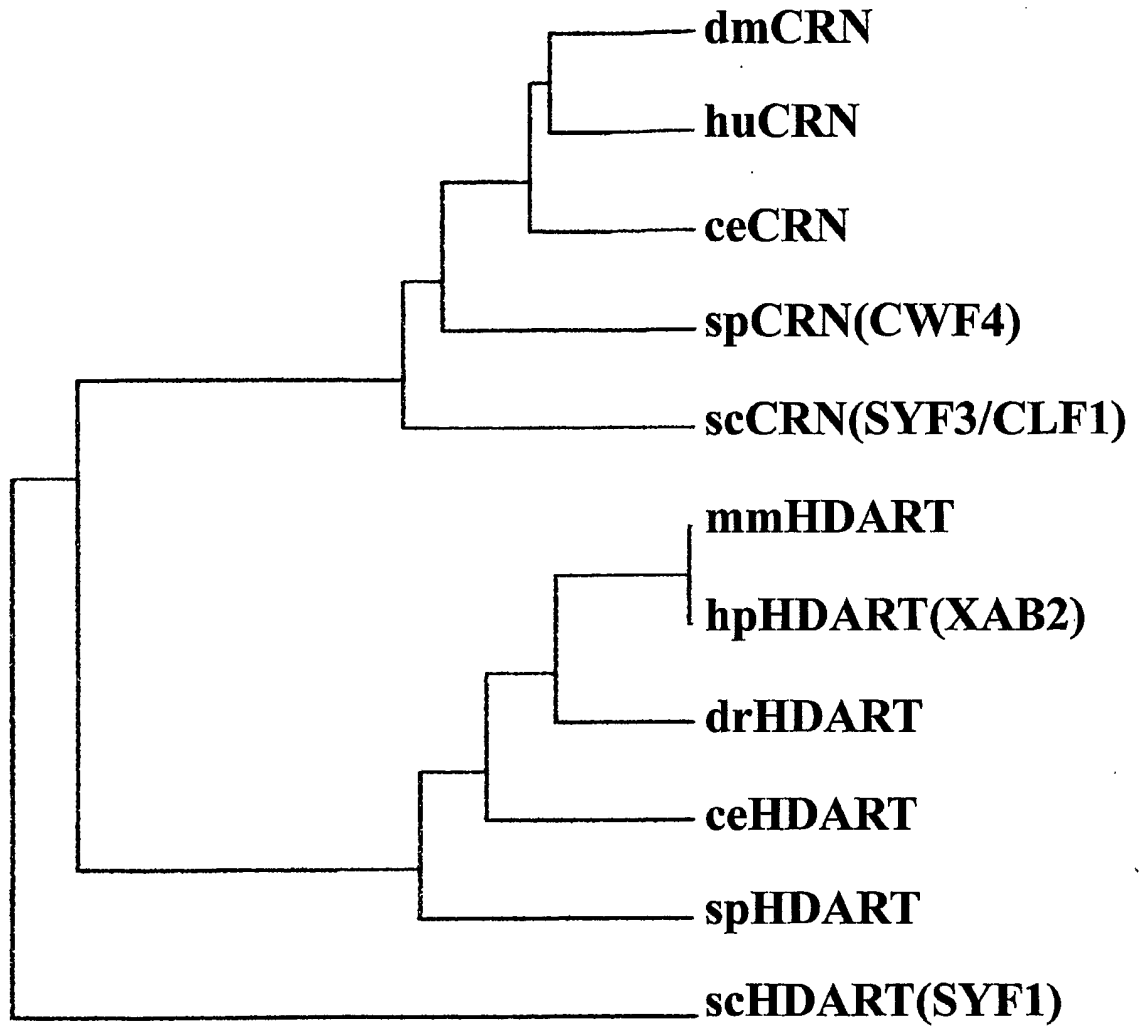
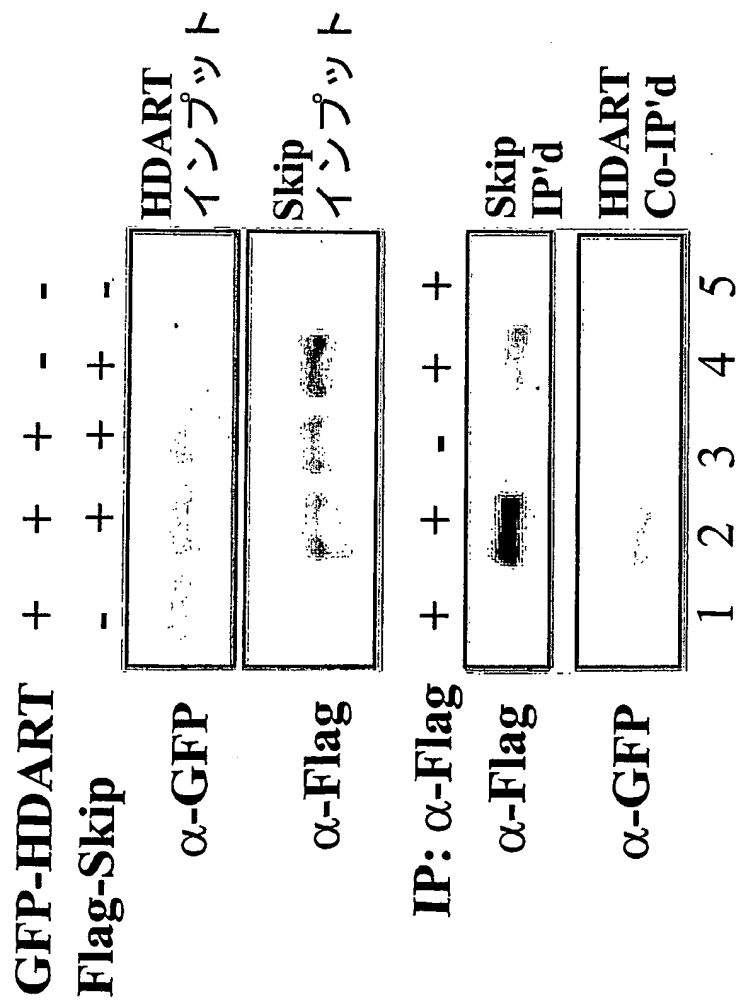




図 4

**A**



**B**

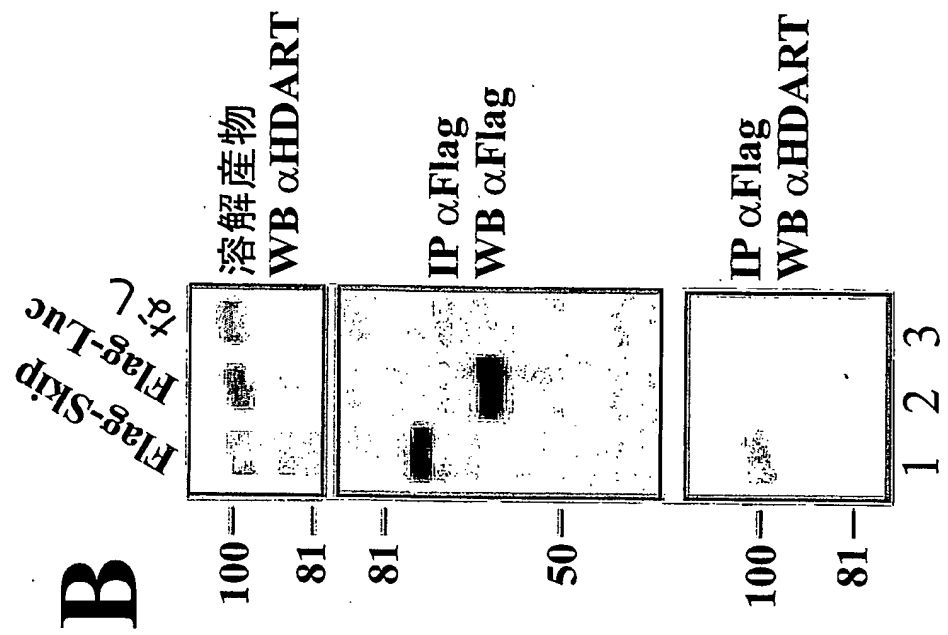


図 5

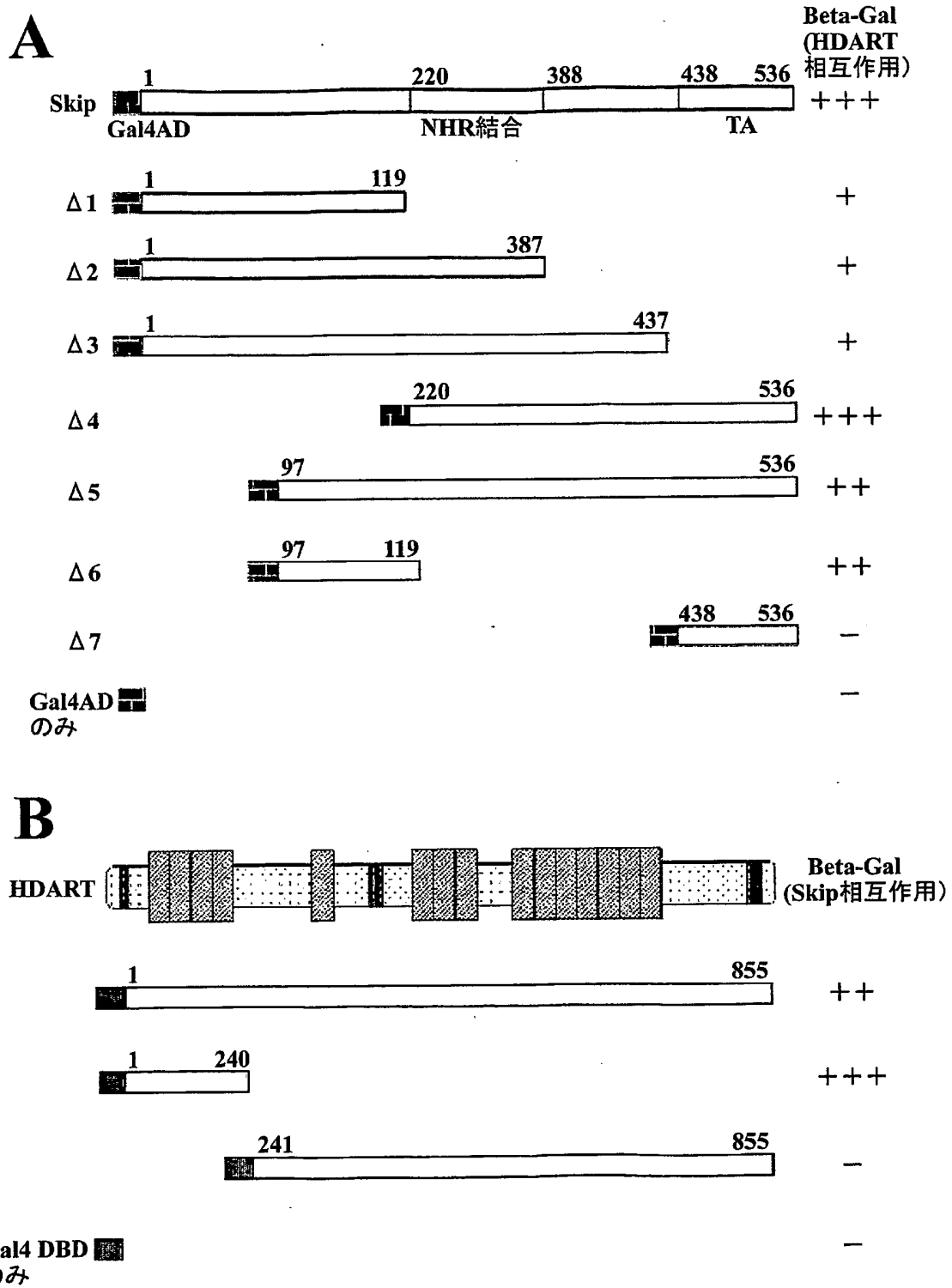
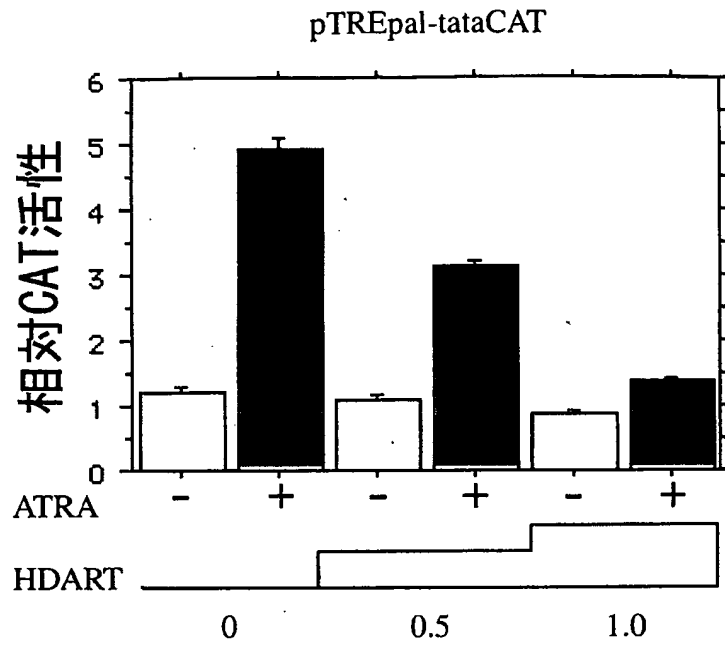


图 6

A



B

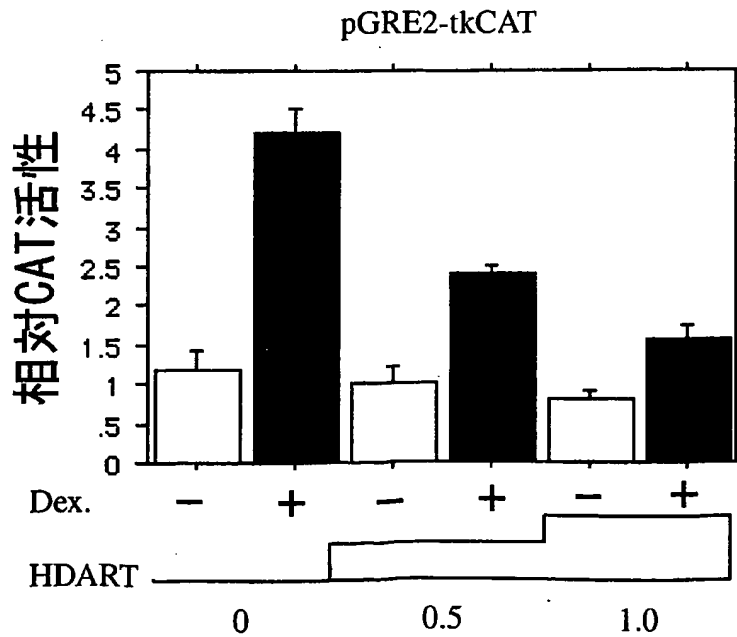


図7

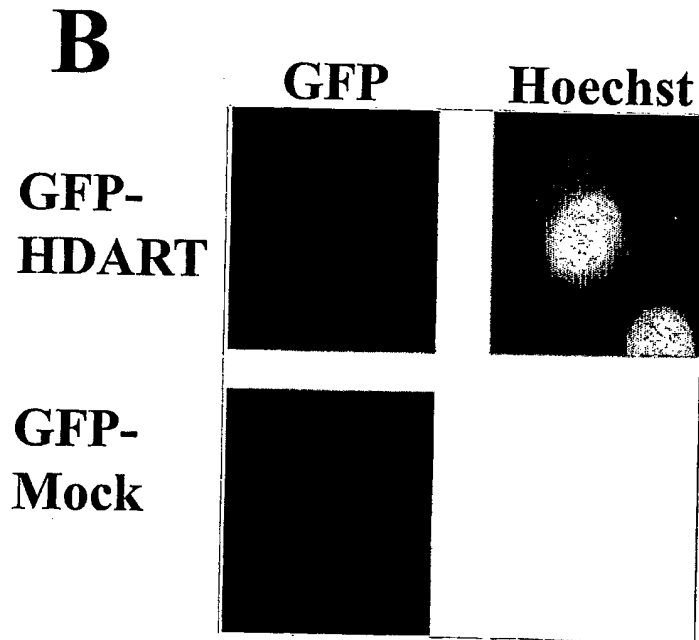
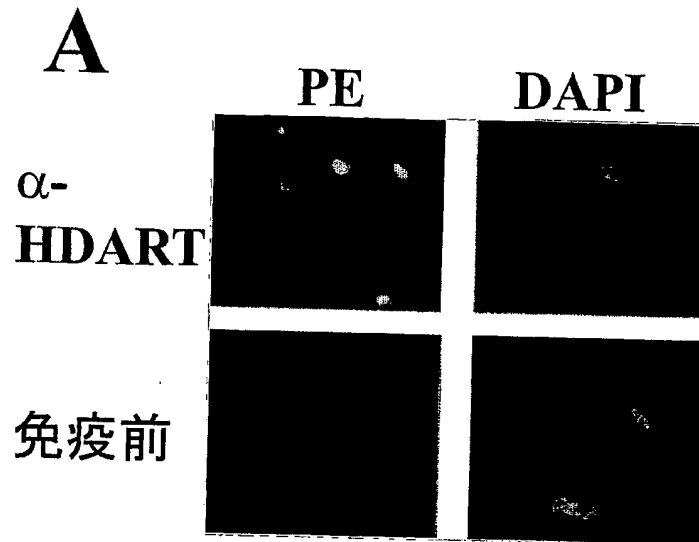


図 8

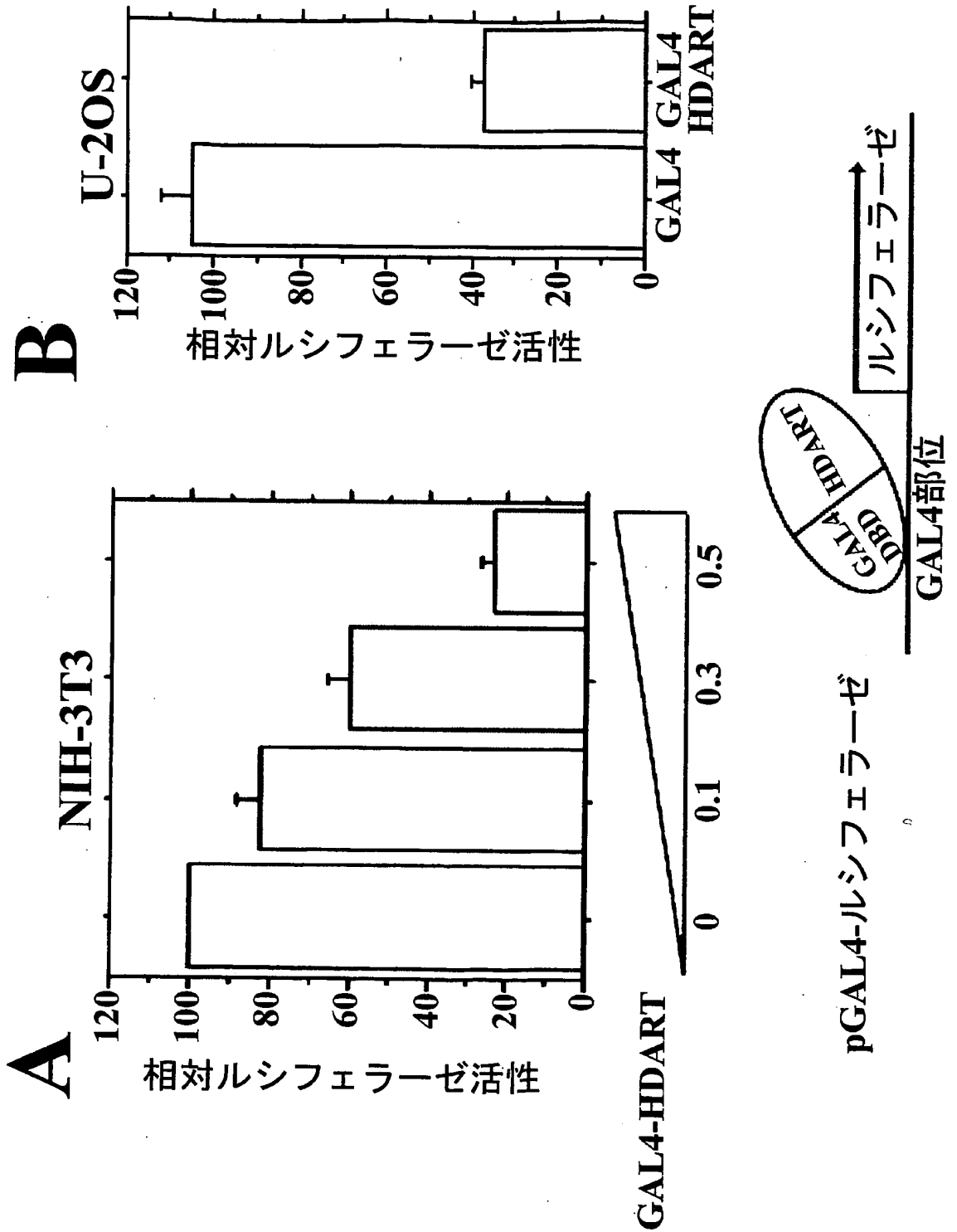


図 9

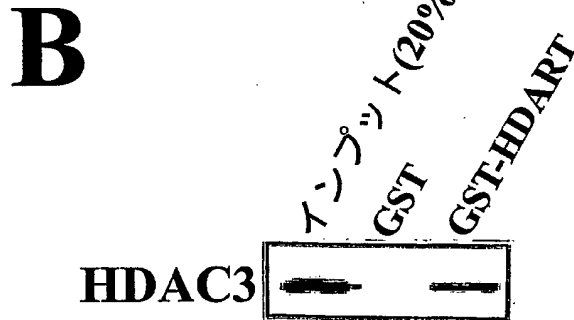
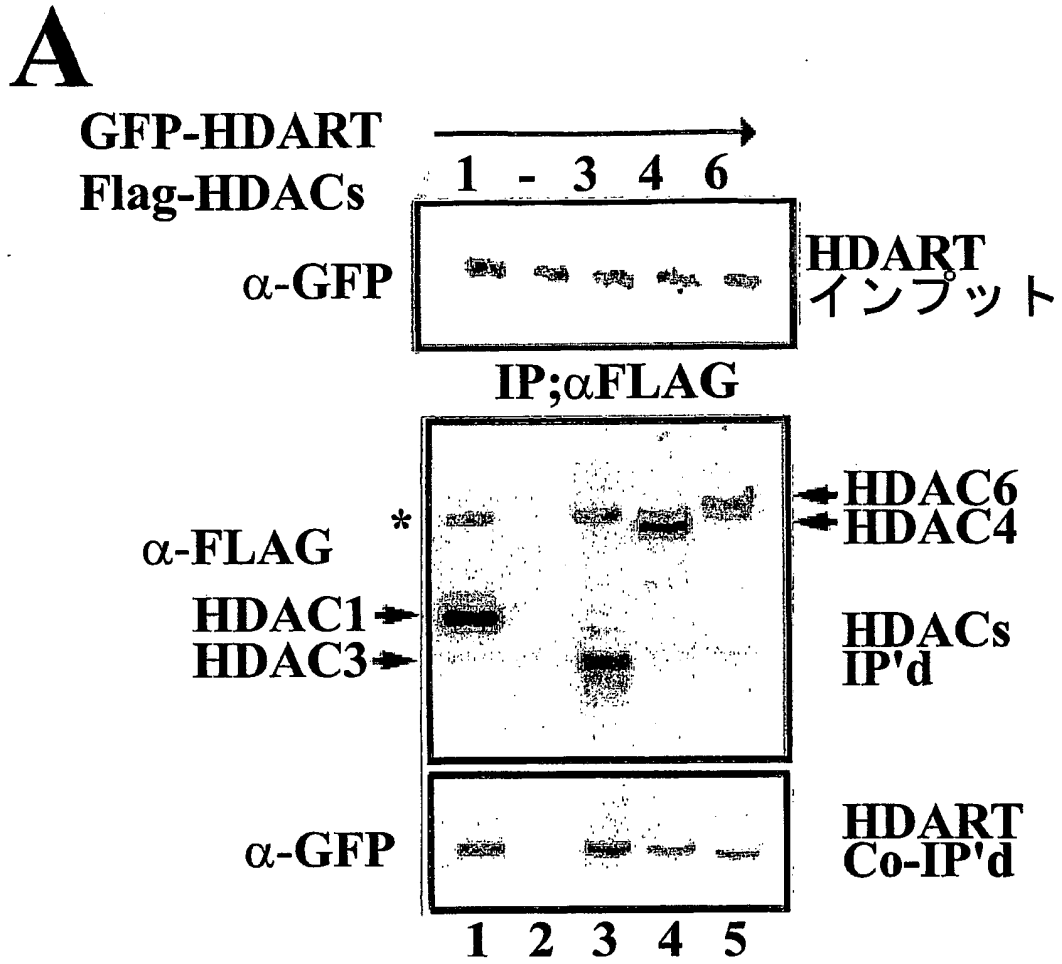
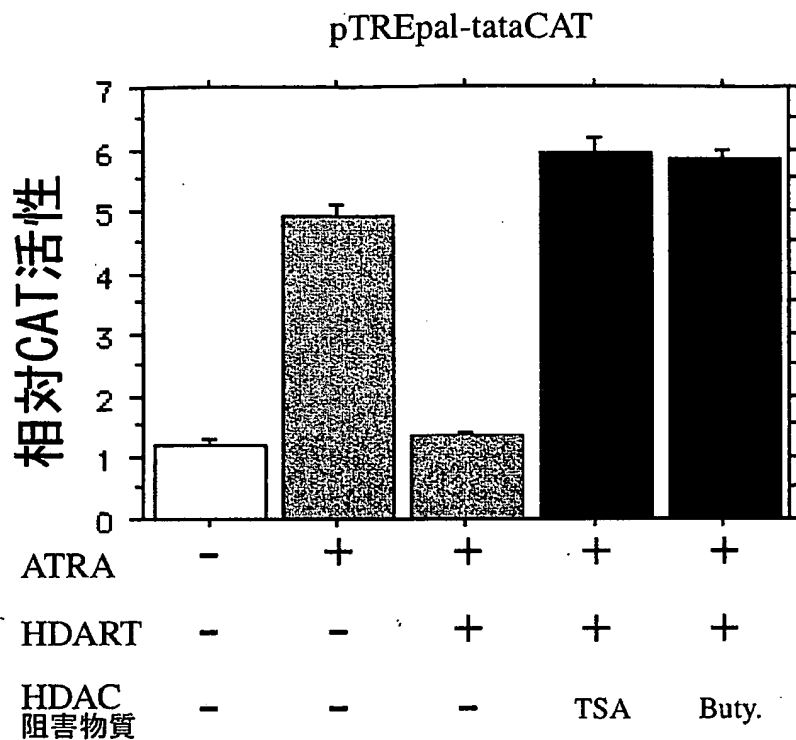


図 10

C



D

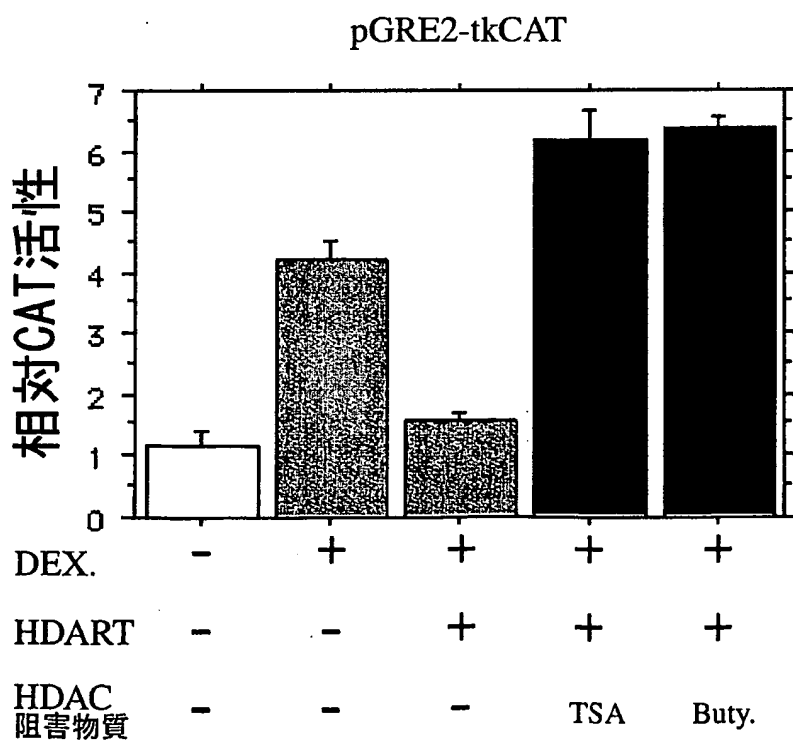


図 1 1

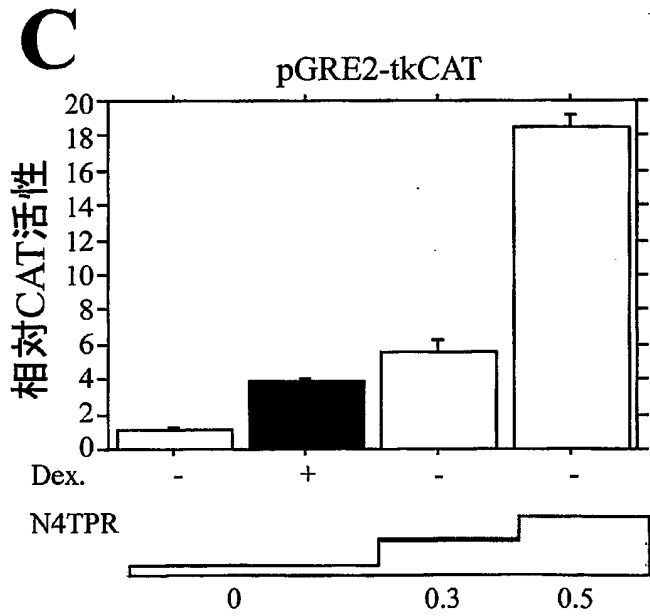
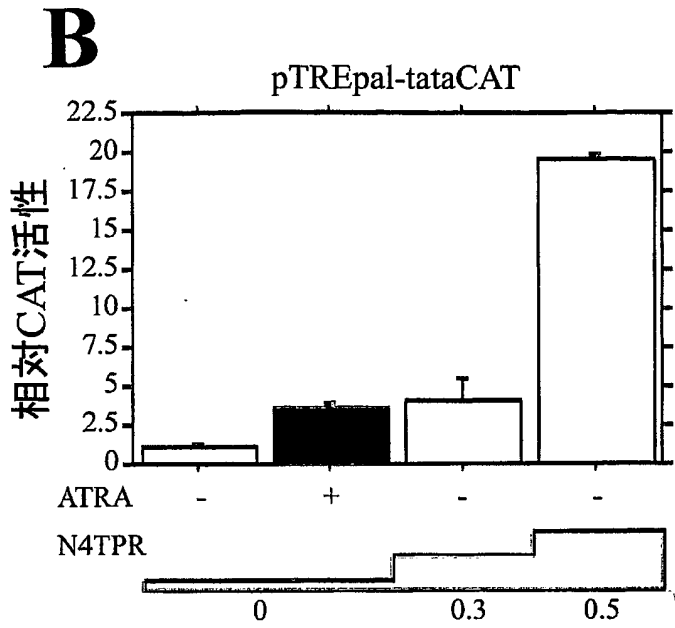
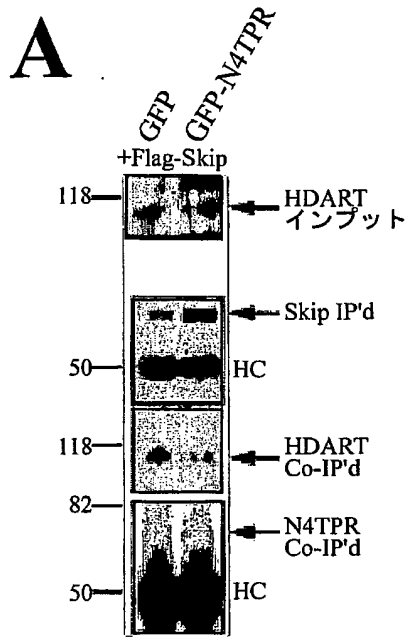
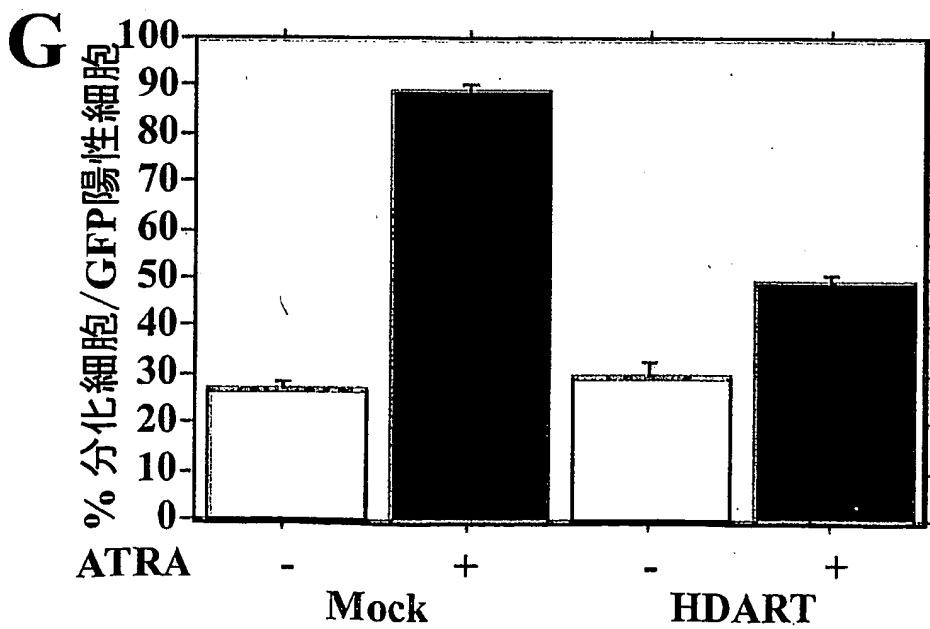
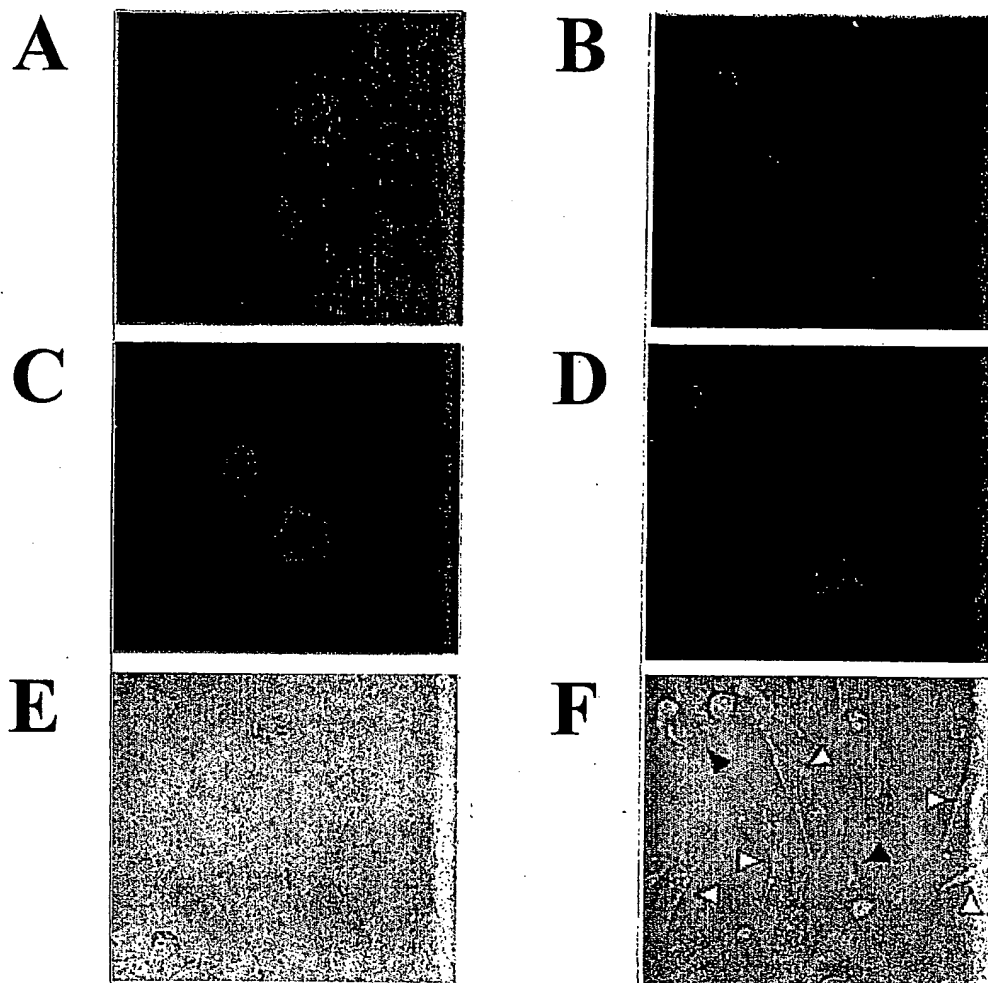




図 12



1 / 17

SEQUENCE LISTING

<110> MIZUTANI, Shuki

YAMADA, Takayuki

<120> Transcription regulating factors

<130> SEN-A0122P

<140>

<141>

<150> JP 2002-217233

<151> 2002-07-25

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2684

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

2 / 17

<222> (37)..(2601)

<400> 1

agcgcgcgac tctcctgtac ctgggcatcc agaaaa atg gtg gtg atg gcg cga 54

Met Val Val Met Ala Arg

1 5

ctt tgc cgg ccc gag cgg ccg gac ctt gtc ttc gag gaa gag gac ctc 102

Leu Ser Arg Pro Glu Arg Pro Asp Leu Val Phe Glu Glu Glu Asp Leu

10 15 20

ccc tat gag gag gaa atc atg cgg aac caa ttc tct gtc aaa tgc tgg 150

Pro Tyr Glu Glu Glu Ile Met Arg Asn Gln Phe Ser Val Lys Cys Trp

25 30 35

ctt cgc tac atc gag ttc aaa cag ggc gcc ccg aag ccc agg ctc aat 198

Leu Arg Tyr Ile Glu Phe Lys Gln Gly Ala Pro Lys Pro Arg Leu Asn

40 45 50

cag cta tac gag cgg gca ctc aag ctg ctg ccc tgc agc tac aaa ctc 246

Gln Leu Tyr Glu Arg Ala Leu Lys Leu Leu Pro Cys Ser Tyr Lys Leu

55 60 65 70

tgg tac cga tac ctg aag gcg cgt cgg gca cag gtg aag cat cgc tgt 294

Trp Tyr Arg Tyr Leu Lys Ala Arg Arg Ala Gln Val Lys His Arg Cys

75 80 85

3 / 17

gtg acc gac cct gcc tat gaa gat gtc aac aac tgt cat gag agg gcc 342  
 Val Thr Asp Pro Ala Tyr Glu Asp Val Asn Asn Cys His Glu Arg Ala  
                   90                  95                  100

ttt gtg ttc atg cac aag atg cct cgt ctg tgg cta gat tac tgc cag 390  
 Phe Val Phe Met His Lys Met Pro Arg Leu Trp Leu Asp Tyr Cys Gln  
                   105                  110                  115

ttc ctc atg gac cag ggg cgc gtc aca cac acc cgc cgc acc ttc gac 438  
 Phe Leu Met Asp Gln Gly Arg Val Thr His Thr Arg Arg Thr Phe Asp  
                   120                  125                  130

cgt gcc ctc cgg gca ctg ccc atc acg cag cac tct cga att tgg ccc 486  
 Arg Ala Leu Arg Ala Leu Pro Ile Thr Gln His Ser Arg Ile Trp Pro  
 135                  140                  145                  150

ctg tat ctg cgc ttc ctg cgc tca cac cca ctg cct gag aca gct gtg 534  
 Leu Tyr Leu Arg Phe Leu Arg Ser His Pro Leu Pro Glu Thr Ala Val  
                   155                  160                  165

cga ggc tat cgg cgc ttc ctc aag ctg agt cct gag agt gca gag gag 582  
 Arg Gly Tyr Arg Arg Phe Leu Lys Leu Ser Pro Glu Ser Ala Glu Glu  
                   170                  175                  180

tac att gag tac ctc aag tca agt gac cgg ctg gat gag gcc gcc cag 630

4 / 17

Tyr Ile Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Asp Arg Leu Asp Glu Ala Ala Gln

185

190

195

cgc ctg gcc acc gig gtg aac gac gag cgt ttc gtg tct aag gcc ggc 678

Arg Leu Ala Thr Val Val Asn Asp Glu Arg Phe Val Ser Lys Ala Gly

200

205

210

aag tcc aac tac cag ctg tgg cac gag ctg tgc gac ctc atc tcc cag 726

Lys Ser Asn Tyr Gln Leu Trp His Glu Leu Cys Asp Leu Ile Ser Gln

215

220

225

230

aat ccg gac aag gta cag tcc ctc aat gtg gac gcc atc atc cgc ggc 774

Asn Pro Asp Lys Val Gln Ser Leu Asn Val Asp Ala Ile Ile Arg Gly

235

240

245

ggc ctc acc cgc ttc acc gac cag ctg ggc aag ctc tgg tgt tct ctc 822

Gly Leu Thr Arg Phe Thr Asp Gln Leu Gly Lys Leu Trp Cys Ser Leu

250

255

260

gcc gac tac tac atc cgc agc ggc cat ttc gag aag gct cgg gac gtg 870

Ala Asp Tyr Tyr Ile Arg Ser Gly His Phe Glu Lys Ala Arg Asp Val

265

270

275

tac gag gag gcc atc cgg aca gtg atg acc gtg cgg gac ttc aca cag 918

Tyr Glu Glu Ala Ile Arg Thr Val Met Thr Val Arg Asp Phe Thr Gln

280

285

290

5 / 17

gtg ttt gac agc tac gcc cag ttc gag gag agc atg atc gct gca aag 966  
 Val Phe Asp Ser Tyr Ala Gln Phe Glu Glu Ser Met Ile Ala Ala Lys  
 295 300 305 310

atg gag acc gcc tcg gag ctg ggg cgc gag gag gag gat gat gtg gac 1014  
 Met Glu Thr Ala Ser Glu Leu Gly Arg Glu Glu Glu Asp Asp Val Asp  
 315 320 325

ctg gag ctg cgc ctg gcc cgc ttc gag cag ctc atc agc cgg cgg ccc 1062  
 Leu Glu Leu Arg Leu Ala Arg Phe Glu Gln Leu Ile Ser Arg Arg Pro  
 330 335 340

ctg ctc ctc aac agc gtc ttg ctg cgc caa aac cca cac cac gtg cac 1110  
 Leu Leu Leu Asn Ser Val Leu Leu Arg Gln Asn Pro His His Val His  
 345 350 355

gag tgg cac aag cgt gtc gcc ctg cac cag ggc cgc ccc cgg gag atc 1158  
 Glu Trp His Lys Arg Val Ala Leu His Gln Gly Arg Pro Arg Glu Ile  
 360 365 370

atc aac acc tac aca gag gct gtg cag acg gtg gac ccc ttc aag gcc 1206  
 Ile Asn Thr Tyr Thr Glu Ala Val Gln Thr Val Asp Pro Phe Lys Ala  
 375 380 385 390

aca ggc aag ccc cac act ctg tgg gtg gcg ttt gcc aag ttt tat gag 1254

6 / 17

Thr Gly Lys Pro His Thr Leu Trp Val Ala Phe Ala Lys Phe Tyr Glu  
                     395                    400                    405  
  
 gac aac gga cag ctg gac gat gcc cgt gtc atc ctg gag aag gcc acc 1302  
 Asp Asn Gly Gln Leu Asp Asp Ala Arg Val Ile Leu Glu Lys Ala Thr  
                     410                    415                    420  
  
 aag gtg aac ttc aag cag gtg gat gac ctg gca agc gtg tgg tgt cag 1350  
 Lys Val Asn Phe Lys Gln Val Asp Asp Leu Ala Ser Val Trp Cys Gln  
                     425                    430                    435  
  
 tgc gga gag ctg gag ctc cga cac gag aac tac gat gag gcc ttg cgg 1398  
 Cys Gly Glu Leu Glu Leu Arg His Glu Asn Tyr Asp Glu Ala Leu Arg  
                     440                    445                    450  
  
 ctg ctg cga aag gcc acg gcg ctg cct gcc cgc cgg gcc gag tac ttt 1446  
 Leu Leu Arg Lys Ala Thr Ala Leu Pro Ala Arg Arg Ala Glu Tyr Phe  
 455                    460                    465                    470  
  
 gat ggt tca gag ccc gtg cag aac cgc gtg tac aag tca ctg aag gtc 1494  
 Asp Gly Ser Glu Pro Val Gln Asn Arg Val Tyr Lys Ser Leu Lys Val  
                     475                    480                    485  
  
 tgg tcc atg ctc gcc gac ctg gag gag agc ctc ggc acc ttc cag tcc 1542  
 Trp Ser Met Leu Ala Asp Leu Glu Glu Ser Leu Gly Thr Phe Gln Ser  
                     490                    495                    500

7 / 17

acc aag gcc gtg tac gac cgc atc ctg gac ctg cgt atc gca aca ccc 1590  
 Thr Lys Ala Val Tyr Asp Arg Ile Leu Asp Leu Arg Ile Ala Thr Pro  
           505                          510                          515

cag atc gtc atc aac tat gcc atg ttc ctg gag gag cac aag tac ttc 1638  
 Gln Ile Val Ile Asn Tyr Ala Met Phe Leu Glu Glu His Lys Tyr Phe  
           520                          525                          530

gag gag agc ttc aag gcg tac gag cgc ggc atc tcg ctg ttc aag tgg 1686  
 Glu Glu Ser Phe Lys Ala Tyr Glu Arg Gly Ile Ser Leu Phe Lys Trp  
           535                          540                          545                          550

ccc aac gtg tcc gac atc tgg agc acc tac ctg acc aaa ttc att gcc 1734  
 Pro Asn Val Ser Asp Ile Trp Ser Thr Tyr Leu Thr Lys Phe Ile Ala  
                                   555                          560                          565

cgc tat ggg ggc cgc aag ctg gag cgg gca cgg gac ctg ttt gaa cag 1782  
 Arg Tyr Gly Gly Arg Lys Leu Glu Arg Ala Arg Asp Leu Phe Glu Gln  
                           570                          575                          580

gct ctg gac ggc tgc ccc cca aaa tat gcc aag acc ttg tac ctg ctg 1830  
 Ala Leu Asp Gly Cys Pro Pro Lys Tyr Ala Lys Thr Leu Tyr Leu Leu  
           585                          590                          595

tac gca cag ctg gag gag gag tgg ggc ctg gcc cgg cat gcc atg gcc 1878



8 / 17

Tyr Ala Gln Leu Glu Glu Glu Trp Gly Leu Ala Arg His Ala Met Ala  
 600 605 610  
 gtg tac gag cgt gcc acc agg gcc gtg gag ccc gcc cag cag tat gac 1926  
 Val Tyr Glu Arg Ala Thr Arg Ala Val Glu Pro Ala Gln Gln Tyr Asp  
 615 620 625 630  
 atg ttc aac atc tac atc aag cgg gcg gcc gag atc tat ggg gtc acc 1974  
 Met Phe Asn Ile Tyr Ile Lys Arg Ala Ala Glu Ile Tyr Gly Val Thr  
 635 640 645  
 cac acc cgc ggc atc tac cag aag gcc att gag gtg ctg tgc gac gag 2022  
 His Thr Arg Gly Ile Tyr Gln Lys Ala Ile Glu Val Leu Ser Asp Glu  
 650 655 660  
 cac gcg cgt gag atg tgc ctg cgg ttt gca gac atg gag tgc aag ctc 2070  
 His Ala Arg Glu Met Cys Leu Arg Phe Ala Asp Met Glu Cys Lys Leu  
 665 670 675  
 ggg gag att gac cgc gcc cgg gcc atc tac agc ttc tgc tcc cag atc 2118  
 Gly Glu Ile Asp Arg Ala Arg Ala Ile Tyr Ser Phe Cys Ser Gln Ile  
 680 685 690  
 tgt gac ccc cgg acg acc ggc gcg ttc tgg cag acg tgg aag gac ttt 2166  
 Cys Asp Pro Arg Thr Thr Gly Ala Phe Trp Gln Thr Trp Lys Asp Phe  
 695 700 705 710

9 / 17

gag gtc egg cat ggc aat gag gac acc atc aag gaa atg ctg cgt atc 2214  
Glu Val Arg His Gly Asn Glu Asp Thr Ile Lys Glu Met Leu Arg Ile  
715 720 725

egg cgc agc gtg cag gcc acg tac aac acg cag gtc aac ttc atg gcc 2262  
Arg Arg Ser Val Gln Ala Thr Tyr Asn Thr Gln Val Asn Phe Met Ala  
730 735 740

tcg cag atg ctc aag gtc tcg ggc agt gcc acg ggc acc gtg tct gac 2310  
Ser Gln Met Leu Lys Val Ser Gly Ser Ala Thr Gly Thr Val Ser Asp  
745 750 755

ctg gcc cct ggg cag agt ggc atg gac gac atg aag ctg ctg gaa cag 2358  
Leu Ala Pro Gly Gln Ser Gly Met Asp Asp Met Lys Leu Leu Glu Gln  
760 765 770

cgg gca gag cag ctg gcg gct gag gcg gag cgt gac cag ccc ttg cgc 2406  
Arg Ala Glu Gln Leu Ala Ala Glu Ala Glu Arg Asp Gln Pro Leu Arg  
775 780 785 790

gcc cag agc aag atc ctg ttc gtg agg agt gac gcc tcc cgg gag gag 2454  
Ala Gln Ser Lys Ile Leu Phe Val Arg Ser Asp Ala Ser Arg Glu Glu  
795 800 805

ctg gca gag ctg gca cag cag gtc aac ccc gag gag atc cag ctg ggc 2502

10 / 17

Leu Ala Glu Leu Ala Gln Gln Val Asn Pro Glu Glu Ile Gln Leu Gly

810

815

820

gag gac gag gac gag gac gag atg gac ctg gag ccc aac gag gtt cgg 2550

Glu Asp Glu Asp Glu Asp Glu Met Asp Leu Glu Pro Asn Glu Val Arg

825

830

835

ctg gag cag cag agc gtg cca gcc gca gtg ttt ggg agc ctg aag gaa 2598

Leu Glu Gln Gln Ser Val Pro Ala Ala Val Phe Gly Ser Leu Lys Glu

840

845

850

gac tgaccggtcc ctcccccatc cccccctccc accccctccc caatacagct 2651

Asp

855

acgtttgtac aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 2684

<210> 2

<211> 855

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Val Val Met Ala Arg Leu Ser Arg Pro Glu Arg Pro Asp Leu Val

1

5

10

15

11 / 17

Phe Glu Glu Glu Asp Leu Pro Tyr Glu Glu Glu Ile Met Arg Asn Gln  
 20 25 30

Phe Ser Val Lys Cys Trp Leu Arg Tyr Ile Glu Phe Lys Gln Gly Ala  
 35 40 45

Pro Lys Pro Arg Leu Asn Gln Leu Tyr Glu Arg Ala Leu Lys Leu Leu  
 50 55 60

Pro Cys Ser Tyr Lys Leu Trp Tyr Arg Tyr Leu Lys Ala Arg Arg Ala  
 65 70 75 80

Gln Val Lys His Arg Cys Val Thr Asp Pro Ala Tyr Glu Asp Val Asn  
 85 90 95

Asn Cys His Glu Arg Ala Phe Val Phe Met His Lys Met Pro Arg Leu  
 100 105 110

Trp Leu Asp Tyr Cys Gln Phe Leu Met Asp Gln Gly Arg Val Thr His  
 115 120 125

Thr Arg Arg Thr Phe Asp Arg Ala Leu Arg Ala Leu Pro Ile Thr Gln  
 130 135 140

His Ser Arg Ile Trp Pro Leu Tyr Leu Arg Phe Leu Arg Ser His Pro

1 2 / 1 7

145                      150                      155                      160  
Leu Pro Glu Thr Ala Val Arg Gly Tyr Arg Arg Phe Leu Lys Leu Ser  
                                 165                      170                      175  
Pro Glu Ser Ala Glu Glu Tyr Ile Glu Tyr Leu Lys Ser Ser Asp Arg  
                                 180                      185                      190  
Leu Asp Glu Ala Ala Gln Arg Leu Ala Thr Val Val Asn Asp Glu Arg  
                                 195                      200                      205  
Phe Val Ser Lys Ala Gly Lys Ser Asn Tyr Gln Leu Trp His Glu Leu  
                                 210                      215                      220  
Cys Asp Leu Ile Ser Gln Asn Pro Asp Lys Val Gln Ser Leu Asn Val  
225                      230                      235                      240  
Asp Ala Ile Ile Arg Gly Gly Leu Thr Arg Phe Thr Asp Gln Leu Gly  
                                 245                      250                      255  
Lys Leu Trp Cys Ser Leu Ala Asp Tyr Tyr Ile Arg Ser Gly His Phe  
                                 260                      265                      270  
Glu Lys Ala Arg Asp Val Tyr Glu Glu Ala Ile Arg Thr Val Met Thr  
                                 275                      280                      285

13 / 17

Val Arg Asp Phe Thr Gln Val Phe Asp Ser Tyr Ala Gln Phe Glu Glu

290 295 300

Ser Met Ile Ala Ala Lys Met Glu Thr Ala Ser Glu Leu Gly Arg Glu

305 310 315 320

Glu Glu Asp Asp Val Asp Leu Glu Leu Arg Leu Ala Arg Phe Glu Gln

325 330 335

Leu Ile Ser Arg Arg Pro Leu Leu Leu Asn Ser Val Leu Leu Arg Gln

340 345 350

Asn Pro His His Val His Glu Trp His Lys Arg Val Ala Leu His Gln

355 360 365

Gly Arg Pro Arg Glu Ile Ile Asn Thr Tyr Thr Glu Ala Val Gln Thr

370 375 380

Val Asp Pro Phe Lys Ala Thr Gly Lys Pro His Thr Leu Trp Val Ala

385 390 395 400

Phe Ala Lys Phe Tyr Glu Asp Asn Gly Gln Leu Asp Asp Ala Arg Val

405 410 415

Ile Leu Glu Lys Ala Thr Lys Val Asn Phe Lys Gln Val Asp Asp Leu

420 425 430

14 / 17

Ala Ser Val Trp Cys Gln Cys Gly Glu Leu Glu Leu Arg His Glu Asn  
435 440 445

Tyr Asp Glu Ala Leu Arg Leu Leu Arg Lys Ala Thr Ala Leu Pro Ala  
450 455 460

Arg Arg Ala Glu Tyr Phe Asp Gly Ser Glu Pro Val Gln Asn Arg Val  
465 470 475 480

Tyr Lys Ser Leu Lys Val Trp Ser Met Leu Ala Asp Leu Glu Glu Ser  
485 490 495

Leu Gly Thr Phe Gln Ser Thr Lys Ala Val Tyr Asp Arg Ile Leu Asp  
500 505 510

Leu Arg Ile Ala Thr Pro Gln Ile Val Ile Asn Tyr Ala Met Phe Leu  
515 520 525

Glu Glu His Lys Tyr Phe Glu Glu Ser Phe Lys Ala Tyr Glu Arg Gly  
530 535 540

Ile Ser Leu Phe Lys Trp Pro Asn Val Ser Asp Ile Trp Ser Thr Tyr  
545 550 555 560

Leu Thr Lys Phe Ile Ala Arg Tyr Gly Gly Arg Lys Leu Glu Arg Ala

15 / 17

565

570

575

Arg Asp Leu Phe Glu Gln Ala Leu Asp Gly Cys Pro Pro Lys Tyr Ala

580

585

590

Lys Thr Leu Tyr Leu Leu Tyr Ala Gln Leu Glu Glu Glu Trp Gly Leu

595

600

605

Ala Arg His Ala Met Ala Val Tyr Glu Arg Ala Thr Arg Ala Val Glu

610

615

620

Pro Ala Gln Gln Tyr Asp Met Phe Asn Ile Tyr Ile Lys Arg Ala Ala

625

630

635

640

Glu Ile Tyr Gly Val Thr His Thr Arg Gly Ile Tyr Gln Lys Ala Ile

645

650

655

Glu Val Leu Ser Asp Glu His Ala Arg Glu Met Cys Leu Arg Phe Ala

660

665

670

Asp Met Glu Cys Lys Leu Gly Glu Ile Asp Arg Ala Arg Ala Ile Tyr

675

680

685

Ser Phe Cys Ser Gln Ile Cys Asp Pro Arg Thr Thr Gly Ala Phe Trp

690

695

700



16 / 17

Gln Thr Trp Lys Asp Phe Glu Val Arg His Gly Asn Glu Asp Thr Ile

705                      710                      715                      720

Lys Glu Met Leu Arg Ile Arg Arg Ser Val Gln Ala Thr Tyr Asn Thr

725                      730                      735

Gln Val Asn Phe Met Ala Ser Gln Met Leu Lys Val Ser Gly Ser Ala

740                      745                      750

Thr Gly Thr Val Ser Asp Leu Ala Pro Gly Gln Ser Gly Met Asp Asp

755                      760                      765

Met Lys Leu Leu Glu Gln Arg Ala Glu Gln Leu Ala Ala Glu Ala Glu

770                      775                      780

Arg Asp Gln Pro Leu Arg Ala Gln Ser Lys Ile Leu Phe Val Arg Ser

785                      790                      795                      800

Asp Ala Ser Arg Glu Glu Leu Ala Glu Leu Ala Gln Gln Val Asn Pro

805                      810                      815

Glu Glu Ile Gln Leu Gly Glu Asp Glu Asp Glu Asp Glu Met Asp Leu

820                      825                      830

Glu Pro Asn Glu Val Arg Leu Glu Gln Gln Ser Val Pro Ala Ala Val

835                      840                      845

17 / 17

Phe Gly Ser Leu Lys Glu Asp

850

855

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP03/09443

<p><b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N5/08, C12Q1/68</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>												
<p><b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl<sup>7</sup> C07K1/00-C07K19/00, C12N1/00-C12N15/90, C12Q1/00-C12Q3/00</p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI/BIOSIS (DIALOG), GenBank/DDBJ/EMBL/GenSeq, SwissProt/PIR/GenSeq</p>												
<p><b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 01/60855 A1 (SHANGHAI CANCER INSTITUTE), 23 August, 2001 (23.08.01), Claims; examples &amp; CN 1309135 A                      &amp; AU 3358701 A &amp; GenSeq database Accession No.AAG64591, AAH75606</td> <td>1-13</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 01/07471 A2 (INCYTE GENOMICS, INC.), 01 February, 2001 (01.02.01), Claims; examples &amp; EP 1196577 A                      &amp; AU 6230700 A &amp; GenSeq database Accession No.AAB60506, AAF59643</td> <td>1-13</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 01/60855 A1 (SHANGHAI CANCER INSTITUTE), 23 August, 2001 (23.08.01), Claims; examples & CN 1309135 A                      & AU 3358701 A & GenSeq database Accession No.AAG64591, AAH75606	1-13	X	WO 01/07471 A2 (INCYTE GENOMICS, INC.), 01 February, 2001 (01.02.01), Claims; examples & EP 1196577 A                      & AU 6230700 A & GenSeq database Accession No.AAB60506, AAF59643	1-13	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
X	WO 01/60855 A1 (SHANGHAI CANCER INSTITUTE), 23 August, 2001 (23.08.01), Claims; examples & CN 1309135 A                      & AU 3358701 A & GenSeq database Accession No.AAG64591, AAH75606	1-13										
X	WO 01/07471 A2 (INCYTE GENOMICS, INC.), 01 February, 2001 (01.02.01), Claims; examples & EP 1196577 A                      & AU 6230700 A & GenSeq database Accession No.AAB60506, AAF59643	1-13										
<p><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.      <input type="checkbox"/> See patent family annex.</p>												
<p>* Special categories of cited documents:</p> <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier document but published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&amp;" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention											
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
<p>Date of the actual completion of the international search 21 August, 2003 (21.08.03)</p>		<p>Date of mailing of the international search report 02 September, 2003 (02.09.03)</p>										
<p>Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office</p>		<p>Authorized officer</p>										
<p>Facsimile No.</p>		<p>Telephone No.</p>										

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/09443

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/64834 A2 (HYSEQ, INC.), 07 September, 2001 (07.09.01), Claims; examples & AU 4187301 A & GenSeq database Accession No.AAU27734, AAS44634	1-13
X	NAKATSU Y. et al., XAB2, a Novel Tetratricopeptide Repeat Protein Involved in Transcription-coupled DNA Repair and Transcription., J.Biol.Chem., 2000, Vol.275, No.45, pages 34931 to 34937 & SwissProt database Accession No.Q9HCS7	1-13
A	WO 99/58559 A2 (REGC UNIV. CALIFORNIA.), 18 November, 1999 (18.11.99), Claims; examples & JP 2002-514402 A & EP 1076710 A	1-13
A	WO 00/58473 A2 (CURAGEN CORP.), 05 October, 2000 (05.10.00), Claims; examples & EP 1165784 A & AU 3774500 A	1-13

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))                  Int Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N5/08, C12Q1/68</p>		
<p>B. 調査を行った分野                  調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))                  Int Cl<sup>7</sup> C07K1/00-C07K19/00, C12N1/00-C12N15/90, C12Q1/00-C12Q3/00,</p>		
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p>		
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)                  WPI/BIOSIS (DIALOG),                  GenBank/DDBJ/EMBL/GenSeq, SwissProt/PIR/GenSeq</p>		
<p>C. 関連すると認められる文献</p>		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 01/60855 A1 (SHANGHAI CANCER INSTITUTE), 2001. 08. 23. 特許請求の範囲、各実施例 &CN 1309135 A &AU 3358701 A &GenSeq database Accession No. AAG64591, AAH75606	1-13
X	WO 01/07471 A2 (INCYTE GENOMICS, INC.), 2001. 02. 01. 特許請求の範囲、各実施例 &EP 1196577 A &AU 6230700 A &GenSeq database Accession No. AAB60506, AAF59643	1-13
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>		
<p>* 引用文献のカテゴリー                  「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの                  「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの                  「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)                  「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献                  「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献                  「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの                  「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの                  「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの                  「&amp;」 同一パテントファミリー文献</p>		
国際調査を完了した日	21. 08. 03	国際調査報告の発送日 02.09.03
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 田中 耕一郎	4B 9636
<p>電話番号 03-3581-1101 内線 3446</p>		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 01/64834 A2 (HYSEQ, INC.) , 2001. 09. 07, 特許請求の範囲、各実施例 &AU 4187301 A &GenSeq database Accession No. AAU27734, AAS44634	1-13
X	Nakatsu Y., et al., XAB2, a Novel Tetratricopeptide Repeat Protein Involved in Transcription-coupled DNA Repair and Transcription., J. Biol. Chem., 2000, Vol.275, No.45, p34931-34937 &SwissProt database Accession No. Q9HCS7	1-13
A	WO 99/58559 A2 (REGC UNIV. CALIFORNIA.) , 1999. 11. 18, 特許請求の範囲、各実施例 &JP 2002-514402 A &EP 1076710 A	1-13
A	WO 00/58473 A2 (CURAGEN CORPORATION.) , 2000. 10. 05, 特許請求の範囲、各実施例 &EP 1165784 A &AU 3774500 A	1-13